

**Der Colliculus superior des Kaninchens
und seine wichtigsten Afferenzen.
Vergleichend licht- und elektronenmikroskopische
Untersuchung unter Verwendung einer
neu entwickelten Tracer Methode**

Nikolaus Schönitzer

1982



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554007_0102

Der Colliculus superior des Kaninchens und seine wichtigsten
Afferenzen. Vergleichend licht- und elektronenmikroskopische
Untersuchung unter Verwendung einer neu entwickelten Tracer

Methode

Dissertation der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von Nikolaus Schönlitzer
aus Innsbruck

Januar 1982



1. Berichterstatter: Prof. Dr. P. Bruckmoser
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Neuweiler
- Sondervotum: Prof. Dr. H. Holländer

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Mai 1982

I N H A I T

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	2
2.1	Die Tiere	2
2.2	Operative Techniken	3
2.3	Technische Daten zu den Injektionen und Perfusionen	6
2.4	Histologische Techniken	7
2.5	Silberimprägnationen - Degenerationsunter- suchungen	7
2.6	Autoradiographie	8
2.7	Histochemische Technik - HRP	9
2.8	Elektronenmikroskopische Techniken	9
3.	Ergebnisse	12
3.1	Aufbau und Gliederung der oberflächlichen Schichten des Colliculus superior	12
3.1.1	Stratum zonale	12
3.1.2	Stratum griseum superficiale	13
3.1.3	Stratum opticum	14
3.1.4	Elektronenmikroskopische Untersuchung des Neuropils	15
3.2	Retinale und kortikale Afferenzen des Colliculus superior	21
3.2.1	Retinotectale Projektion	21
3.2.1.1	Lichtmikroskopische Untersuchungen	21
3.2.1.2	Elektronenmikroskopische Untersuchung	24

3.2.2	Kortikotectale Projektion	30
3.2.2.1	Lichtmikroskopische Untersuchungen	30
3.2.2.2	Elektronenmikroskopische Untersuchung	33
4.	Diskussion	37
4.1	Diskussion zum Aufbau der oberflächlichen Schichten des Colliculus superior	37
4.1.1	Abgrenzung und Bezeichnung der drei oberflächlichen Schichten	37
4.1.2	Vergleich mit anderen Tieren	39
4.1.3	Diskussion zur Ultrastruktur des Neuropils	40
4.2.	Räumliche Verteilung der untersuchten Afferenzen	41
4.2.1	Ausdehnung der untersuchten Terminalfelder	41
4.2.2	Tiefenverteilung der untersuchten Projektionen	44
4.2.3	Zur Überlappung des retinalen und kortikalen Terminalgebietes im Colliculus superior	46
4.2.4	Vergleich mit anderen Tieren	47
4.3	Zur Ultrastruktur der retinalen und kortikalen Axone und ihrer Boutons	49
5.	Anhang	
	Methodische Untersuchung	53
5.1	Einleitung - HRP als anterograder Tracer	53
5.2	Getestete Methoden	54
5.3	Lichtmikroskopische Ergebnisse	54
5.4	Elektronenmikroskopische Ergebnisse	56
5.5	Empfohlene TMB Methode	58
5.6	Diskussion	60

6.	Verwendete Abkürzungen	62
7.	Literaturverzeichnis	63
8.	Zusammenfassung	75

1. E I N F Ü H R U N G

Nervenimpulse der Retina werden über Axone der Ganglienzellen durch den Nervus opticus zum Gehirn geleitet. Im Chiasma opticum kreuzen, je nach Art, alle oder ein grosser Teil dieser Axone auf die Gegenseite um die primären Sehzentren im Mittel- und Zwischenhirn zu erreichen. Die wichtigsten primären Sehzentren bei den Säugetieren sind der Colliculus superior im Mittelhirn und das Genikulatum laterale im Zwischenhirn. Vom Genikulatum laterale wird die Erregung weitergeleitet zum Kortex, der seinerseits zum Genikulatum zurückprojiziert. Auch der Colliculus superior erhält eine starke Afferenz von der Sehrinde, projiziert selbst aber nicht dorthin zurück.

Der Colliculus superior besteht aus mehreren Lagen, die man heute allgemein in zwei Gruppen einteilt (RODIECK, 1979; HARTING et al., 1973): die oberflächlichen und die tiefen Schichten. Nur die oberflächlichen Schichten (Stratum zonale, Stratum griseum superficiale, Stratum opticum) werden direkt von der Retina innerviert und sind ausschliesslich visuell. Die unter dem Stratum opticum liegenden tiefen Schichten reagieren sowohl auf visuelle als auch auf somatische, akustische und andere Reize. Die wichtigsten Afferenzen der oberen Schichten des Colliculus superior sind, ausser der Retina, die primäre Sehrinde und andere Kortexgebiete, sowie der Nucleus paraventricularis, ein kleines Kerngebiet im lateralen Tegmentum. In der vorliegenden Untersuchung wird der Aufbau der oberflächlichen Schichten des Colliculus superior des Kaninchens licht- und elektronenmikroskopisch beschrieben. Ausserdem werden die retinalen Afferenzen und die Afferenzen aus der primären Sehrinde

untersucht. Dabei kommt neben den klassischen Methoden eine neue Methode zur Anwendung, die im Anhang beschrieben wird.

Das Kaninchen war aus mehreren Gründen besonders geeignet als Versuchstier für diese Untersuchung: Es hat ein relativ grosses Gehirn, ein gut entwickeltes visuelles System, und es lässt sich relativ leicht halten und züchten.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Die Tiere

Für die vorliegende Untersuchung wurden adulte Kaninchen vom Stamm Chbb:CH verwendet. Dieser aus Klein-Chinchilla und Bastardtieren hervorgegangene Stamm wird seit 1969 von Fa. Thomae (Biberach) in geschlossener Kolonie gezüchtet. Eine Gruppe dieser Kaninchen wird seit Jahren am Max-Planck-Institut für Psychiatrie (München) gehalten.

Da bei der Untersuchung lebende Tiere operiert werden mussten (siehe Tierschutzgesetz § 8) wurde von der Regierung von Oberbayern eine Genehmigung (Nr. 211-5319a 44/80) eingeholt.

Die Art der verschiedenen Versuche und die Anzahl der verwendeten Tiere ist in Tab. 1 zusammengestellt. Es wurden nur erwachsene, gesunde Kaninchen verwendet.

2.2 Operative Techniken

Narkose und Medikamente

Vor jedem operativen Eingriff wurden die Kaninchen so stark betäubt, dass sie selbst auf starke Schmerzreize nicht mehr reagierten. Verschiedene Anästhetika wurden getestet ("Urethan", "Nembutal", "Halothan", "Pacifan"). Am besten bewährte sich jedoch folgende Narkose, die in den meisten Fällen angewendet wurde: Ketamin-HCl (25mg/kg Körpergewicht, "Vetalar", Parke-Davis) und Xylazin (5mg/kg Körpergewicht, "Rompun", Bayer) als Gemisch i.m. gespritzt mit zusätzlicher Äthernarkose und subcutaner Injektion von 0,05 mg Atropinsulfat. Bei länger dauernden Operationen wurde nach ca. 30 Minuten eine zweite Vetalar-Rompun Dosis gegeben. Vor Perfusionen wurde stets eine Überdosis injiziert.

Tiere, die länger als einen Tag nach der Operation überleben sollten, erhielten ein Breitbandantibiotikum (100 mg/kg Körpergewicht i.m., "Totocillin", Bayer). Bei Augeninjektionen wurde neben einer leichten Allgemeinnarkose ein ophthalmologisches Lokalanästhetikum (Benoxinat-HCl, "Conjunecin", Dr. Mann) sowie postoperativ eine antibiotische Augensalbe (Gentamycin) gegeben.

	Gruppe	Operation	Injektion	Anzahl Tiere	Überlebens- zeit	Einbettung	Färbung
Normalmaterial LM	A			2		Celloidin	NI, WO
	B			1		Flacheinb. Celloidin	WO
Normalmaterial EM und Semi- dünnschnitte	C			4		Araldit Flacheinbett.	Phenyl- dianilin Metylenblau
	D	Kortex- injektion	³ H-Leucin	2	1d	Paraffin	NI
Autoradiographie	E	Augen- injektion	³ H-Leucin	1	1d	Paraffin	NI
	F	Läsion im vis. Kortex		1	7d	Gefrier- schnitt	NL, FH, NI
Degenerations- untersuchung	G	Enuclea- tion		2	4d	Gefrier- schnitt	NL, FH, NI
	H	Kortex- injektion	HRP	9	1-2d	Gefrier- schnitt, zT Chopper	TMB - LM DAB
Meerrettich- peroxidase (HRP)	J	Kortex- injektion	HRP	4	2d	Araldit Flacheinbett.	TMB - LM TMB - EM
	K	Augen- injektion	HRP	2	2d	Gefrier- schnitte	TMB - LM DAB
	L	Augen- injektion	HRP	3	2d	Araldit Flacheinbett.	TMB - LM TMB - EM

Tab. 1

Übersicht zu den verschiedenen Experimenten.

Abkürzungen: NI, NISSL-Färbung; WO, WOELKE - Markscheidenfärbung;

FH, Silberimprägnierung nach FINK und HEIMER; NL, Silberimprägnierung nach NAUTA-LAIDLAW; TMB, siehe die im Anhang beschriebene Methode.

Kortexinjektion bzw. -läsion

(Tiere der Gruppen D, F, H und J, Tabelle 1)

Nach Befestigung des Kopfes in einem stereotaktischen Rahmen wurde das Os parietale über der linken Hemisphäre freigelegt. In der Mitte zwischen der Sutura coronalis und der Sutura lambdoidea einerseits sowie zwischen der Sutura sagittalis und dem Tuber parietale wurde ein Loch (ca. 5 mm) in den Knochen gebohrt. Für Injektionen in die Hirnrinde wurde die Dura geöffnet, für Läsionen wurde sie nicht geöffnet sondern nur ein elektrisch erhitztes Metallplättchen (Thermistor) daraufgelegt. Anschliessend wurde Fibrinogen Schaum ("Gelita Tampon") auf die Wunde gelegt und diese mit Klammern oder Naht verschlossen.

Augeninjektion

(Tiere der Gruppen E, K und I, Tab. 1)

Zunächst wurde durch Punktieren der vorderen Augenkammer der intraoculäre Druck reduziert anschliessend durch die Sclera (etwa im Bereich der Ora serrata) langsam von Hand in den nasalen Teil des Glaskörpers injiziert.

Enucleation

(Tiere der Gruppe G, Tab. 1)

Um die Retina vollständig zu zerstören wurde der ganze Augapfel in der von MARKOWITZ et al. (1964) beschriebenen Weise entfernt.

Perfusion

Nach Freilegung des Herzens von ventral wurden das rechte Herzohr sowie der linke Ventrikel geöffnet. Durch den im Bereich der Herzspitze gelegenen Einschnitt wurde eine Kanüle bis in die Aorta ascendens geschoben. Durch diese wurde die Perfusionsflüssigkeit mit einem Druck von 20 - 100 mg Hg durch

das Gefäßsystem des Kaninchens gepumpt (CLARK, 1978).

2.3 Technische Daten zu den Injektionen und Perfusionen

Apparative Vorrichtung für Kortexinjektionen

Um eine gleichmässige, erschütterungsfreie und langsame Injektion zu ermöglichen, wurde bei Kortexinjektionen die Spritze (1 μ l oder 5 μ l Hamilton Spritze mit konischer Spitze) an einen Mikromanipulator montiert. Für den Vorschub wurde ein mechanischer Motorinjektor benutzt, der über ein ölgefülltes Schlauchsystem auf den Kolben der Spritze drückt (näheres siehe SCHUBERT und HOLLÄNDER, 1975). Die Injektionsdauer betrug ca. 5 min bei den 3 H-Leucininjektionen (Tab. 1, Gruppe D), 20 - 35 min bei HRP Injektionen (Tab. 1, Gruppe H und I).

In einem Experiment der Gruppe K wurde mit Hilfe einer Nadelspitze ein kleines HRP Depot in den Kortex appliziert (siehe SCHÖNITZER und HOLLÄNDER, 1982).

HRP-Lösung (Meerretichperoxidase, siehe 2.7)

Bei Kortexinjektionen (Gruppe H und I, Tab. 1) wurden 1 bis 3 μ l einer 25%igen HRP Lösung injiziert, der 2% Dimethylsulfoxid (DMSO) und 1% Poli-L-Ornithin zugesetzt waren (HADLEY und TRACHTENBERG, 1978; ITAYA et al., 1978; KEEFER, 1978; WEST und BLACK, 1979). Bei den Experimenten der Gruppe K und I (Augeninjektionen) wurden 150 μ l einer 10 - 15%igen HRP Lösung mit 1% DMSO und 0,5% Ornithin injiziert.

Leucinlösung

Von der mit Tritium markierten, L-Leucinlösung (Amersham, Radiochemical Center, spezifische Aktivität 51 Ci/mM) wurde eine adequate Menge entnommen, unter Stickstoff eingedunstet und mit 10 μ l physiologischer NaCl-Lösung aufgenommen. Bei den Kortexinjektionen (Gruppe D) wurden 0,5 μ l (entsprechend 40 bzw. 60 μ Ci) injiziert, bei der Augeninjektion (Gruppe F) wurde 100 μ l (1 mCi) injiziert.

Perfusionen

Bei Experimenten der Gruppen A, B, D, E, F und G (Tab. 1) wurde zuerst mit etwa 1/2 l physiologischer Kochsalzlösung perfundiert und anschliessend mit 1 - 2 l 4% Formollösung. In der Gruppe C wurde ein Tier nach GUILLERY (1969) perfundiert, die anderen nach PETERS (1970), jeweils mit zusätzlichem Vorspülen (1/2 l 6% Dextran).

Bei den HRP Experimenten wurden bei den ersten 6 Versuchen (einer aus Gruppe K, die anderen aus Gruppe H, Tab. 1) verschiedene Perfusionen getestet, schliesslich wurde die folgende als gut befunden und beibehalten. Sie ist einerseits so, dass möglichst wenig HRP Aktivität durch die Fixierung zerstört wird, führt aber dennoch zu einer ausreichenden Gewebserhaltung (KIM und STRICK, 1976, MALMGREN und OLSSON, 1978, ROSENE und MESUJAM, 1978). Zuerst wurde mit etwa 1/2 Liter 6% Dextran vorgespült, dann etwa 30 Minuten lang fixiert (2 - 3 l 3% Glutaraldehyd mit 0,02% CaCl_2 in 0,1 M Cacodylatpuffer, pH 7,4), und schliesslich das überschüssige Fixans wieder mit etwa 1 liter Puffer aus dem Gefäßsystem gespült.

Nach der Perfusion wurde das Gehirn freipräpariert und bei HRP Experimenten möglichst sofort geschnitten, höchstens über Nacht in eiskaltem Puffer aufbewahrt, sonst wurde das Gehirn einige Tage bis Wochen im entsprechenden Fixans imergiert.

2.4. Histologische Techniken

Wie aus Tabelle 1 ersichtlich wurden die Gehirne (i.d.R. ohne Frontalkortex und Cerebellum) in Celloidin oder Paraffin eingebettet oder gefrierageschnitten. Soweit am selben Material licht- und elektronenmikroskopisch gearbeitet werden sollte, wurden "Chopper"-Schnitte verwendet (siehe Absatz 2.8). Die Schnittrichtung war stets transversal (ausser B, Tab. 1, siehe unten). NISSI Färbung wurde mit Thionin oder Kresylviolett erzielt, Markscheidenfärbung nach WOELKE (näheres zu diesen Techniken siehe: CLARK 1978).

Von einem Tier (B in Tab. 1) wurde der Colliculus superior herausgeschnitten und ausgehöhlt, dass nur die oberen Schichten blieben. Diese wurden zwischen 2 Objektträgern flachgepresst, eine Woche in 4% Formol gehärtet, in Celloidin eingebettet, "flach" geschnitten und nach WOELKE gefärbt. Durch diese Präparation ist die Schnittebene parallel zu den Schichten des Colliculus superior.

2.5 Silber Imprägnationen - Degenerationsuntersuchungen (Tab. 1, Gruppen G, H, I)

Bei der Darstellung neuronaler Verbindungen mit der anterograden Degenerationsmethode werden Axone operativ (hier durch Enucleation bzw. Kortexläsion) von den Zellkörpern getrennt, worauf nach einer entsprechenden Überlebenszeit die Axone

degenerieren. *Aufgrund ihrer starken Argyophilie können diese degenerierenden Fasern und Endigungen (Boutons) selektiv mit Silber imprägniert werden. GIOIII und KARAMANLIDIS (1978) referieren und diskutieren die verschiedenen Techniken und gehen dabei insbesondere auf Schwierigkeiten in der Auswertung und Deutung ein. In der vorliegenden Untersuchung wurden die Methoden nach NAUTA-IAIDIAW (NAUTA, 1957) und die Methode I nach FINK und HEIMER (1967) zur Darstellung degenerierender Fasern bzw. Boutons angewendet.

2.6 Autoradiographie

(Tabelle 1, Gruppen E, F)

Beim anterograden Protein-tracing wird eine radioaktiv markierte Aminosäure ins Ursprungsgebiet der zu untersuchenden Projektion (hier Auge bzw. visueller Kortex) gespritzt. Die Aminosäure (Ieucin) wird von den Zellen in den Stoffwechsel aufgenommen und unter anderem in Proteine eingebaut, die durch die Axone zu deren Endigungen transportiert werden. Dort kann man sie nach einer entsprechenden Überlebenszeit autoradiographisch nachweisen. Dazu werden die aufgezogenen Paraffinschnitte rehydriert, bei Rotlicht in eine Fotoemulsion getaucht (Kodak NTB 3, 1:1 mit H₂O verdünnt), getrocknet und ca. 3 Wochen exponiert. Nach Entwicklung (Kodak D 19) und Fixierung werden die Schnitte mit Thionin gefärbt (näheres siehe HENDRICKSON und EDWARDS, 1978). Eine Markierung ist dann als mehr oder weniger dichte Häufung von Silberkörnern auf dem histologischen Schnitt zu erkennen.

2.7 Histochemische Technik - HRP

Die Verwendung von Meerrettichperoxidase (HRP) als Tracer beruht darauf, dass HRP (sowohl retrograd als auch anterograd) im Axon transportiert wird und anschliessend durch seine enzymatischen Eigenschaften am histologischen Schnitt nachgewiesen werden kann (zur Übersicht siehe ASCHOFF und SCHÖNITZER, 1982). In der vorliegenden Arbeit wurde die im Anhang näher erläuterte Methode angewendet. Zum Teil wurde nach ADAMS (1980) mit Thionin gegengefärbt.

Nach HRP Injektionen in den visuellen Kortex (Gruppe H und I, Tab. 1) wurde zur Kontrolle der Injektionsstelle der entsprechende Teil des Kortex gefriereschnitten und mit DAB nach MALMGREEN und OISSON (1978) reagiert.

2.8 Elektronenmikroskopische Techniken

Bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde grosser Wert auf den Vergleich mit lichtmikroskopischen Ergebnissen gelegt. Nach der Perfusion wurde aus dem Gehirn das Mittelhirn herausgenommen und ohne Einbettung in Serie (transversal, 60 - 80 µm dick) geschnitten. Dazu wurde ein umgebautes Mikrotom mit einer vibrierenden Rasierklinge verwendet (HOLLÄNDER, 1981). Von diesen "Chopper"-Schnitten wurde ein Teil histologisch bzw. histochemisch für IM weiterverarbeitet. Benachbarte Schnitte wurden mit Osmium nachfixiert, dehydriert und flach in Araldit ("Durcupan") eingebettet, in dem sie zwischen einem Plastikplättchen und einem Stück Perlongewebe fixiert wurden (HOLLÄNDER, 1981).

Mit Hilfe der benachbarten lichtmikroskopischen Schnitte konnten aus den für EM in Kunststoff eingebetteten Schnitten gezielt solche Stücke herausgesägt werden, die im Terminalfeld der entsprechenden Projektion lagen. Die Stücke wurden auf Leerblöcke aufgeklebt und getrimmt. Dann wurden einige Semidünnschnitte (1 - 3 μ m dick) geschnitten und mit Phenylendiamin (HOLLÄNDER und VAAIAND, 1968) oder Methylenblau (ANDRES, 1965) gefärbt. Nach einem zweiten Trimmen wurden Ultradünnschnitte (meist in kleinen Serien) geschnitten, auf befilmte Lochgrids aufgezogen und mit Uranylacetat (gesättigte Lösung in 70% Methanol, 8 min) und Bleinitrat (REYNOLDS, 1963) kontrastiert. Auf diese Weise sind die Semi- und Ultradünnschnitte ebenso wie die histologischen Schnitte transversal orientiert, und ihre Herkunft aus dem Colliculus kann sowohl in rostrocaudaler als auch in mediolateraler Richtung rekonstruiert werden.

In einzelnen Fällen wurden ungefärbte Semidünnschnitte wie von HOLLÄNDER (1970) beschrieben vom Objektträger abgelöst, auf einen Leerblock geklebt, getrimmt und (in der selben Schnittebene) ultradünn geschnitten.

Das verwendete Elektronenmikroskop (ZEISS, EM 10) verfügt über einen X-Y Schreiber, mit dessen Hilfe die Lage der fotografierten Strukturen protokolliert und ihre Tiefe im Colliculus gemessen wurde (STERLING, 1973). Ausserdem konnten dadurch markierte Boutons in Nachbarschnitten wiedergefunden werden.

Bei zwei HRP Experimenten (eines nach Augen- das andere nach Kortexinjektion) wurden einzelne Schnitte im EM systematisch durchsucht, jede Markierung fotografiert und ihre Lage

protokolliert. In dem einen Experiment (Kortexinjektion) wurden dazu Ultradünnschnitte verwendet, die von zwei eingebetteten "Chopper" Schnitten stammten, wobei der eine von der Oberfläche des Colliculus bis in ca. 500 μm Tiefe reichte, der andere von ca. 400 μm bis 950 μm . Im anderen Experiment (Augeninjektion) wurde (durch Wiederaufblocken eines Semidünnschnittes) vom selben Block ein Ultradünnschnitt verwendet, der von der Oberfläche bis ca. 350 μm Tiefe reichte und einer von 450 μm bis 850 μm Tiefe. Die Anzahl der gefundenen Markierungen und markierten Profile wurde in Tiefenstufen von je 25 μm gezählt, und ihre Häufigkeit pro Fläche untersuchten Schnittes berechnet, dabei wurden die Flächen von grösseren Blutgefässen abgezogen. Gruppen von Markierungen, die nicht durch mindestens eine Zellmembran voneinander getrennt lagen, wurden als eine Markierung gezählt.

Zum Grössenvergleich markierter Axone und Boutons wurde ihr kleinster Durchmesser gemessen.

3. E R G E B N I S S E

3.1. Aufbau und Gliederung der oberflächlichen Schichten des Colliculus superior

Die Colliculi superiores haben eine nahezu halbkugelige Form und stossen medial aneinander, wobei sie den Sulcus intercollicularis sagittalis bilden. Die oberen Schichten folgen der äusseren Form wie ineinandergestellte Schalen. Zur sprachlichen Vereinfachung wird die der Oberfläche folgende Richtung, die von der Mittellinie lateralwärts fortschreitend in eine ventrale übergeht im Text "lateral" genannt.

Der cyto- und myeloarchitektonische Aufbau der oberflächlichen Schichten des Colliculus superior des Kaninchens wurde von verschiedenen Autoren beschrieben und gegliedert (KOEILIKER, 1896; WINKLER und POTTER, 1911; KATO, 1941; GERHARD, 1968; MATHERS, 1977c; GEERAEDTS, 1978). Da zum Teil Widersprüche auftreten, und gleiche Bezeichnungen unterschiedlich verwendet wurden, sollen im folgenden die oberflächlichen Schichten kurz beschrieben werden.

3.1.1. Stratum zonale

Die äusserste Schicht ist das Stratum zonale (SZ). Es ist eine dünne (ca. 75 - 100 μ m) auffallend zellarme Schicht, die sich im NISSI-Bild deutlich vom darunterliegenden Stratum griseum superficiale (SGS) abhebt (Abb. 1).

Das SZ gliedert sich in 3 Unterschichten, deren äusserste aus einer schmalen aber dichten Lage von Gliazellen besteht, zwischen denen vereinzelt kleine Nervenzellen liegen.

Die mittlere Schicht des SZ ist ebenso schmal, nahezu frei von Perikaryen, und wird von einer dünnen Schicht myelinisierter Axone gebildet (Abb. 2). Diese Schicht liegt in einer Tiefe von 10 - 40 μm bis 30 - 60 μm unter der Oberfläche (aus Semidünnschnitten gemessen). Die Axone werden sowohl in den Transversalschnitten als auch im Flachpräparat vorwiegend längs bzw. tangential angeschnitten, verlaufen also in ihrer Hauptrichtung medio-lateral. Im lateralen Teil des Colliculus sind diese Fasern erheblich mehr und dichter als medial, rostral mehr als caudal. Häufig sieht man, dass einzelne Fasern sich in die darunterliegenden Schichten erstrecken. Eine Verbindung zwischen den Axonen des SZ und Fasern der Radiatio optica konnte ich nicht sehen.

Der untere Teil des SZ enthält mehr Nervenzellen als die beiden vorgenannten Schichten, aber dennoch ist er vom SGS deutlich durch seine Zellarmut zu unterscheiden. Ausserdem sind die Zellen des SZ in der Regel kleiner als die des SGS. Während die Grenze SZ - SGS im NISSI-Präparat sehr deutlich ist, kann man sie weder im WOEIKE-Präparat noch in den Semidünnschnitten gut sehen.

3.1.2. Stratum griseum superficiale

Auch die nach innen nächste Schicht, das SGS gliedert sich in drei Teilschichten. Von diesen ist das obere SGS die mächtigste und beinhaltet knapp die Hälfte des ganzen SGS, das etwa 600 - 900 μm misst. Das obere SGS ist aus relativ vielen mittelgrossen

Zellen aufgebaut, die teilweise gleichmässig angeordnet sind, teilweise in radialen Reihen oder Gruppen. Der Eindruck einer radialen Strukturierung wird durch die meist radial verlaufenden Kapillaren verstärkt. Medial sind die Zellen des oberen SGS dichter als lateral. Im Markscheidenpräparat zeigt das obere SGS ein lockeres Netz von meist dünnen Fasern ohne deutliche Vorzugsrichtung.

Das mittlere SGS hat erheblich mehr myelinisierte Fasern, wobei radiäre und tangentielle Richtungen vorherrschen. Im NISSI-Bild sieht man weniger Zellen als im oberen SGS, die ausserdem kleiner sind und weniger regelmässig angeordnet. Die mittlere ist die schmalste Unterschicht des SGS.

Das tiefe SGS hat erheblich grössere Nervenzellen als die anderen Teile des SGS und als das SO. Die Perikarya liegen oft in Gruppen. Im WOEIKE-Präparat findet man ein sehr dichtes Netz von kleinen und grossen Markscheiden, dazwischen kleine Bündel von quergeschnittenen Fasern.

3.1.3. Stratum opticum

Das Stratum opticum (SO) wird hauptsächlich von im Transversalschnitt quergeschnittenen Bündeln myelinisierter Fasern gebildet (Abb. 3). Im NISSI-Bild finden wir einige Nervenzellen, die deutlich kleiner und weniger sind als die im darüberliegenden tiefen SGS. Die Axone des SO kommen von rostral aus dem Brachium colliculi superioris in den Colliculus. Das SO ist in seinem caudalen Teil schmaler als in der Mitte und rostral.

Unter dem SO folgt das Stratum griseum intermedium. Im vorderen Teil des Colliculus grenzt das SO ventral an den Nucleus praetectalis posterior.

3.1.4. Elektronenmikroskopische Untersuchung des Neuropils

Das Neuropil der oberflächlichen Schichten des Colliculus wurde unter Berücksichtigung der angegebenen Gliederung im EM untersucht. Da man die Grenze zwischen SZ und SGS in den Semidünnschnitten und im EM kaum erkennen kann wurde diese für die EM Untersuchungen (auch 3.2.1.2 und 3.2.2.2) bei 100 µm Tiefe angenommen. Weil die Perfusion nach PETERS (1970) bessere Gewebserhaltung als nach GUILLERY (1969) ergab, wurde hauptsächlich dieses Material ausgewertet.

Stratum zonale

In den ersten 10 bis 15 µm unter der Oberfläche findet man hauptsächlich flache glöse Lamellen, die parallel zur Oberfläche des Colliculus gerichtet sind, und oft durch Puncta adhaerentia (PETERS et al., 1977) verbunden sind. Dazwischen gibt es dicke glöse Profile, die durch ihren Reichtum an Filamenten auffallen (Abb. 6c, rechts) und die z.T. bis ins tiefere SZ reichen. Zwischen den Glialamellen befinden sich nur vereinzelt neuronale Profile. Darunter folgt eine Schicht mit auffallend vielen kleinen Dendriten, die arm an Organellen sind. Eine andere Populatioun von Dendriten im SZ enthält viele, regelmässig angeordnete Mikrotubuli. Ausserdem befinden sich im Neuropil des SZ Anschnitte von meist sehr kleinen myelinisierten Axonen (vergl. Kap. 3.1).

Im obersten Bereich (bis 25 μm Tiefe) befinden sich nur wenige Boutons, die oft einzeln zwischen den Glialamellen eingebettet sind. Sie sind klein, rund, enthalten wenige Mitochondrien und relativ wenige, locker gepackte runde synaptische Vesikel. Sie bilden gewöhnlich nur eine Synapse, die symmetrisch oder asymmetrisch sein kann.

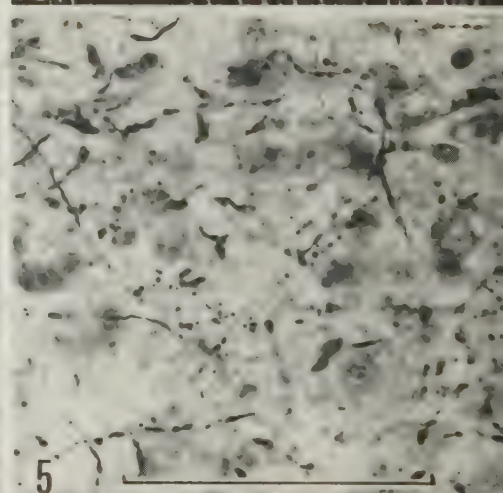
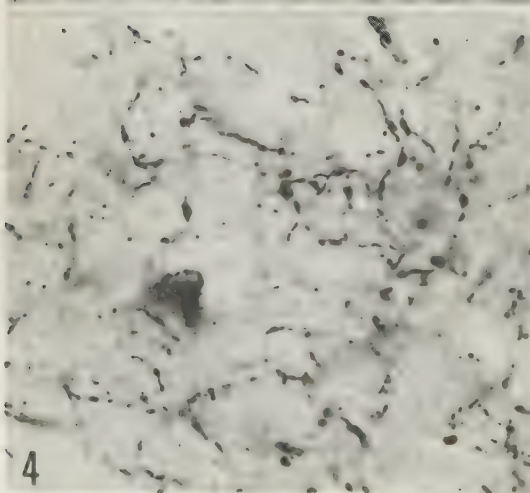
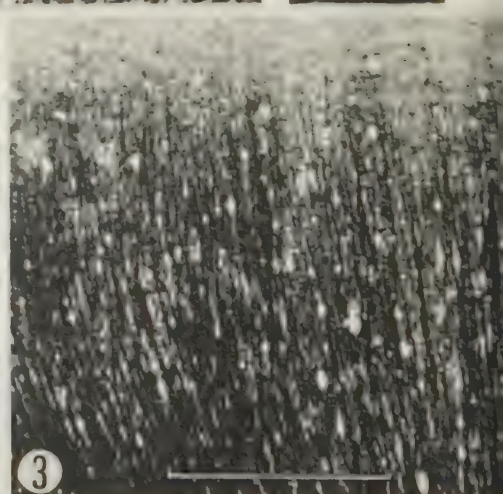
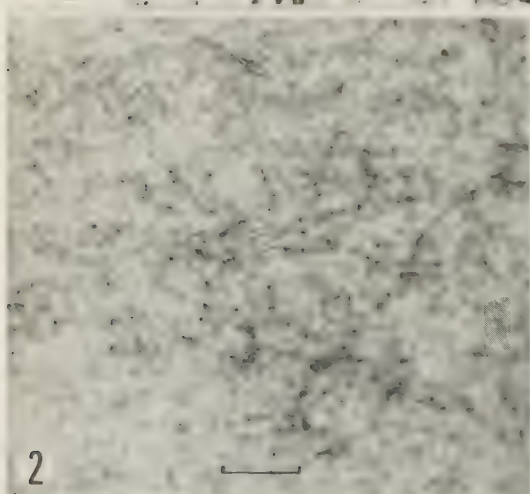
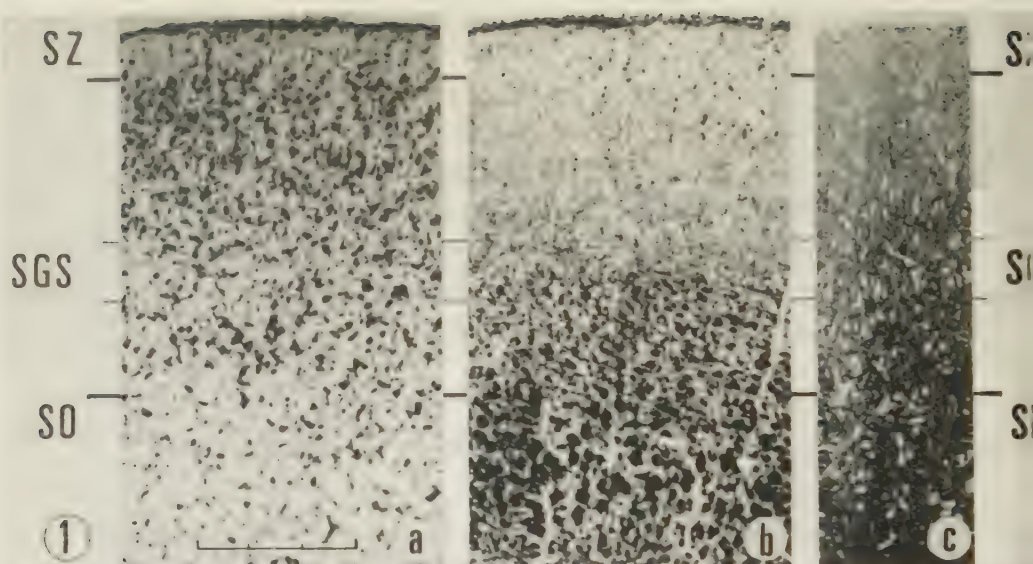
Von den Boutons im darunterliegenden SZ (25 bis 100 μm Tiefe) hat etwa die Hälfte viele, dicht gepackte, runde synaptische Vesikel und bildet asymmetrische Synapsen. Die Hälfte davon wiederum hat helle Mitochondrien, entspricht also den RI-Terminalen ('round vesicles, light mitochondria') nach VRENSSEN und DE GROOT (1977). Diese Boutons liegen häufig in Gruppen nebeneinander und haben synaptischen Kontakt zu oft auffallend kleinen dendritischen aber auch axonalen Profilen. Der zweithäufigste Boutontyp hat runde oder pleomorphe synaptische Vesikel, die nur in der Nähe der Synapse dicht gepackt sind, und ist durch Mikrotubuli gekennzeichnet. Diese Boutons werden als präsynaptische Dendriten gedeutet. Es gibt auch eindeutige präsynaptische Dendriten, d.h. grosse Profile mit Neurotubuli, die hauptsächlich postsynaptisch, an einer Stelle jedoch präsynaptisch sind. Sie haben dort eine lokale Anhäufung synaptischer Vesikel (RAMON-MOLINIER, 1975). Sie bilden symmetrische oder asymmetrische Synapsen. Boutons mit flachen synaptischen Vesikeln (F-Terminalen nach VRENSSEN und DE GROOT, 1977; 'flat vesicles') kommen im SZ vor allem in der Tiefenstufe zwischen 25 und 50 μm vor. Sie bilden oft, aber keineswegs ausschliesslich, symmetrische Synapsen und haben entweder keine oder dunkle Mitochondrien. Schliesslich kommen vereinzelt RD-Terminalen (siehe unten) vor, sowie etwa 10 bis 15% nicht klassifizierte Boutons.

Stratum griseum superficiale

Im oberen SGS befinden sich nur einzelne myelinisierte Axone. Ihre Zahl nimmt im mittleren und tieferen SGS - in Übereinstimmung mit den IM Befunden - deutlich zu. Die Häufigkeit der Synapsen und Boutons ist im oberen SGS und im SZ (außer in dessen obersten Teil) deutlich höher als im mittleren SGS, am niedrigsten ist sie im tiefen SGS.

Auch im SGS haben die meisten Boutons (fast 2/3) viele dicht gepackte runde synaptische Vesikel und asymmetrische Synapsen. Diese Boutons haben im oberen SGS häufig helle Mitochondrien (PI-Terminalen). Im mittleren SGS kommen PI-Terminalen selten, im tiefen SGS kaum vor. Im mittleren und tiefen SGS haben die Boutons mit runden Vesikeln hauptsächlich dunkle Mitochondrien. (PD-Terminalen, VRENSSEN und DE GROOT, 1977; 'round vesicles and dark mitochondria').

Boutons mit flachen Vesikeln haben im SGS fast ausschliesslich symmetrische Synapsen und keine oder dunkle Mitochondrien. Sie kommen am häufigsten im tiefen SGS vor. Die Anzahl der symmetrischen Synapsen im Verhältnis zu den asymmetrischen ist im tiefen SGS am höchsten. Es kommen hier fast ebenso viele symmetrische wie asymmetrische Synapsen vor, während sonst im SZ, SGS und SO etwa 3 - 4 mal mehr asymmetrische Synapsen vorkommen. P-Terminalen nach VRENSSEN und DE GROOT (1977) ('pleomorph vesicles, dark mitochondria') sind selten, aber vorzugsweise im tiefen SGS zu finden. Präsynaptische Dendriten sind nur im oberen SGS zu finden, aber auch dort seltener als im SZ.



Legenden

Abb. 1

Aufbau der oberflächlichen Schichten des Colliculus superior. Die Grenzen der einzelnen Schichten sind durch Balken angedeutet. Für das SGS ist außerdem die Unterteilung in einen oberen, mittleren und tiefen Teil angegeben. a. NISSL Färbung, b. Markscheiden Färbung, 30 μ m Celloidinschnitte, c. Phenylendiamin Färbung, 2 μ m, Semidünnschnitt.

Abb. 2

Fasern des mittleren SZ. Celloidinschnitt, 30 μ m, Markscheidenfärbung. Die Schnittebene ist parallel zur Colliculusoberfläche. Orientierung: rechts ist lateral, unten ist rostral. Die Vorzugsrichtung der Fasern ist medio-lateral. Maßstab: 100 μ m.

Abb. 3

Fasern des SO, die aus der Radiatio optica in den Colliculus einstrahlen. Celloidinschnitt, 30 μ m, Markscheidenfärbung. Die Schnittebene ist parallel zur Colliculusoberfläche. Orientierung wie Abb. 2. Im oberen Teil des Bildes ist das tiefe SGS angeschnitten. Die quergeschnittenen Kapillaren sind als helle "Löcher" zu erkennen. Maßstab: 500 μ m.

Abb. 4

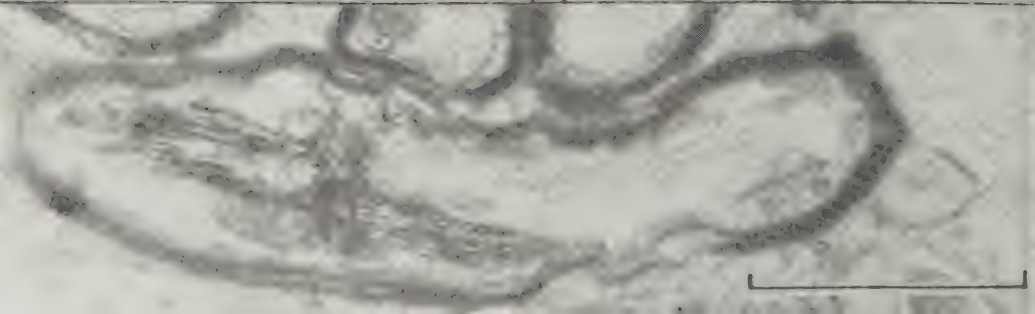
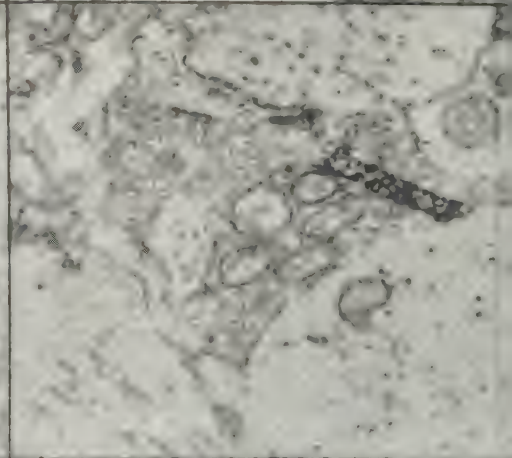
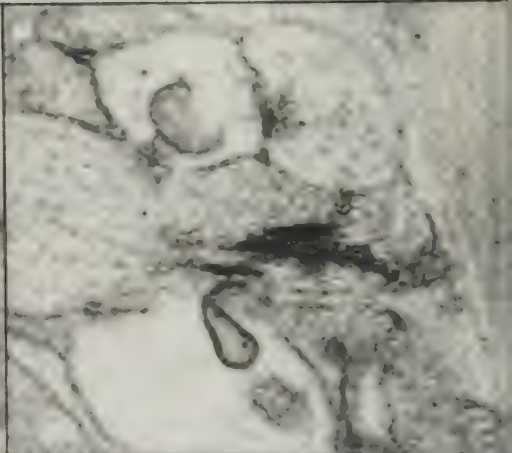
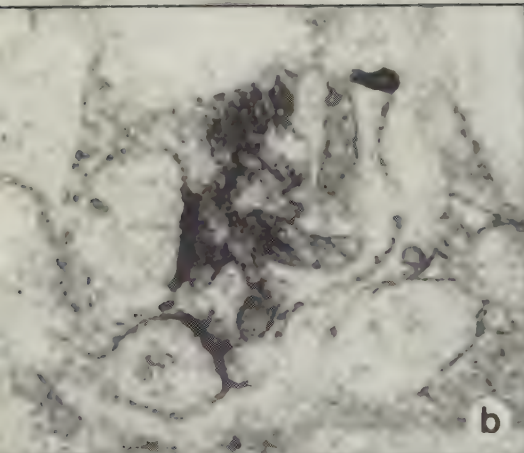
Degenerierende Axone im oberen SGS nach Enucleation des kontralateralen Auges. Silberimprägnation nach FINK und HEIMER. Vergrößerung wie Abb. 5.

Abb. 5

Degenerierende Axone im mittleren SGS nach einer Läsion im primären visuellen Kortex. Silberimprägnation nach NAUTA. Maßstab: 100 μ m.

Abb. 6

TME markierte kortikotectale (a, b, c) und retinotectale Boutons (d,e) und markierte kortikale Faser (f). a. Kortikaler Bouton aus dem oberen SGS, "langer - dünner" Typ. b. Kortikaler Bouton mit dunklen Mitochondrien mit zwei Synapsen. Mittleres SGS. c. Kortikaler Bouton aus dem SZ (ca. 25 μ m unter der Colliculusoberfläche). Rechts im Bild glattes Profil mit vielen Filamenten. d. Retinaler Bouton aus dem SZ, der mit einem Dendrit in synaptischer Verbindung steht. e. Retinaler Bouton aus dem oberen SGS, mit mehreren hellen Mitochondrien. Maßstab: 1 μ m.



Stratum opticum

Im SO dominieren die Bündel myelinisierter Axone, zwischen denen nur wenige Boutons und Synapsen zu finden sind. In SO kommen die gleichen Boutontypen vor wie im SGS, am häufigsten die RD-Terminalen.

3.2. Retinale und kortikale Afferenzen des Colliculus superior

3.2.1. Retinotectale Projektion

3.2.1.1. Lichtmikroskopische Untersuchungen

Degenerationsuntersuchung

Nach Enucleation eines Auges sind im kontralateralen Colliculus durch die Silberimprägnation sowohl degenerierende Fasern als auch degenerierende Boutons zu sehen (siehe Abb. 4). Im vorliegenden Material waren degenerierende Fasern, die in die oberflächlichen Schichten des Colliculus superior einstrahlen, am rostralen Ende des Colliculus vor allem medial zu sehen. Etwas weiter caudal waren auch Fasern zu sehen, die aus dem Brachium colliculi von lateral in den Colliculus einmündeten. Im tiefen und mittleren SGS waren sehr viele degenerierende Fasern imprägniert im darunterliegenden SO weniger. Im tiefen SGS waren zum Teil auffallend dicke Axone imprägniert, oft lagen sie in Bündeln, ihre Hauptrichtung ist latero-medial bzw. rostro-caudal. Im mittleren SGS und dem unteren Teil des oberen SGS bildeten die degenerierenden Fasern ein dichtes Geflecht ohne deutliche Vorzugsrichtung, das sich nach oben auflockerte. Im SZ waren keine degenerierenden Fasern zu finden. Die Faserdegeneration nahm im caudalen Drittel des Colliculus deutlich ab. Nach

Imprägnation nach FINK und HEIMER (1967) sah man darüberhinaus im ganzen SGS, vor allem aber im oberen SGS, kleine, unregelmässig geformte Partikel, die degenerierenden Boutons entsprechen. Am oberen Rand des oberen SGS und im SZ waren nur wenige imprägnierte Boutons zu sehen.

In medio-lateraler Richtung war das Degenerationsmuster nicht homogen: Im vorderen Teil des Colliculus waren im medialen Viertel des SGS besonders viele degenierende Axone und Boutons, weiter hinten waren sie am deutlichsten im lateralen Drittel.

Im homolateralen Colliculus war die Projektion wie von GIOIII und GUTHRIE (1969) beschrieben auf kleine Gebiete im tiefen SGS und oberen SO des lateralen Viertels beschränkt.

Autoradiographie

Nach Injektion von ^3H -Leucin in ein Auge werden durch die Autoradiographie die oberflächlichen Schichten fast des ganzen kontralateralen Colliculus markiert. Grossteils war die Markierung so stark, dass man sie mit blossen Auge sehen konnte. An der Oberfläche des Colliculus war ein ca. 20 bis 40 μm breiter Streifen unmarkiert, der etwa dem oberen und zum Teil dem mittleren SZ entspricht. Direkt darunter war die Markierung am stärksten und erstreckte sich unter stetiger Abnahme an Dichte bis ins SO (Abb. 7).

Rostral war die Markierung im SGS stärker als caudal. Auch das SO war zwar auch im hinteren Drittel des Colliculus noch markiert aber deutlich schwächer als rostral. In der hinteren Hälfte des Colliculus war die Markierung lateral (im SGS) stärker als medial.

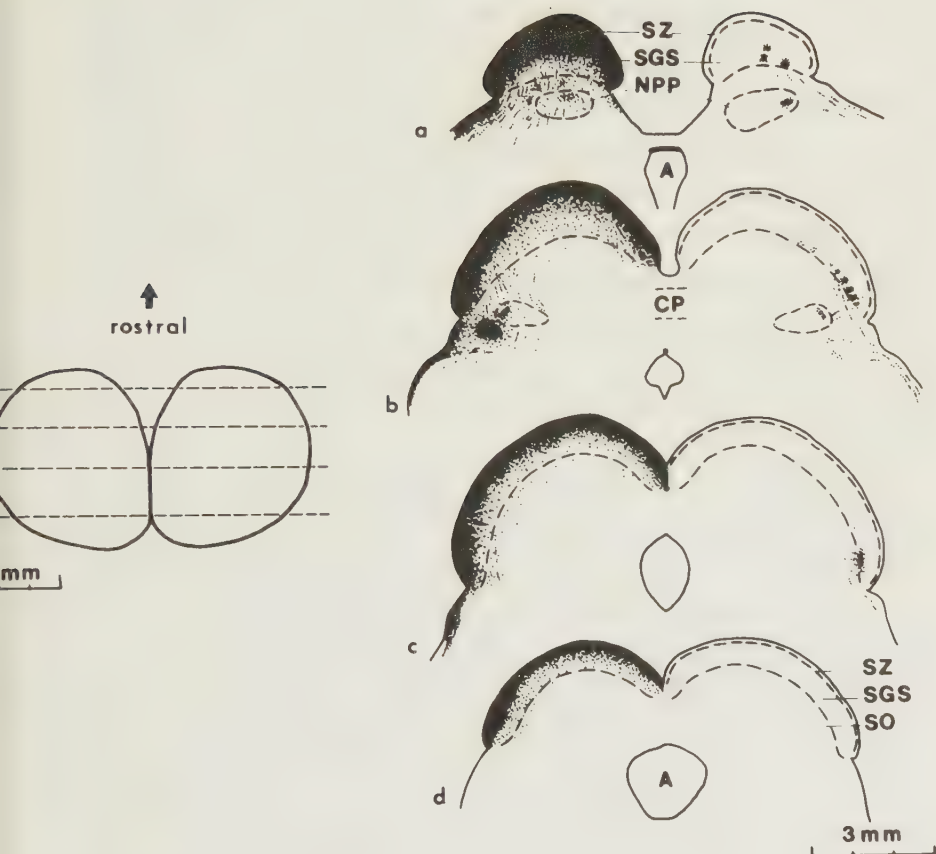


Abb. 7

Retinotectale Projektion.

Vier repräsentative Autoradiographieschnitte durch den Colliculus superior nach ^3H -Leucin Injektion in ein Auge. Schnittrichtung transversal. Die Markierung der ipsilateralen Seite (rechts) ist im Verhältnis zur kontralateralen Markierung (links) stärker gezeichnet. Die Lage der Schnitte ist aus der beigefügten Rekonstruktion der Colliculi (Orthogonalprojektion nach oben) ersichtlich.

CP: Commissura posterior; A: Aqueductus; NPP: Nucleus posterior praetectalis.

Im homolateralen Colliculus waren retino-tectale Terminalfelder auf die beiden rostralen Drittel des Colliculus beschränkt (siehe Abb. 7). Es waren einzelne, kleine, unzusammenhängende Terminalfelder, die grossteils auf das tiefe SGS beschränkt blieben. Zum geringeren Teil erstreckte sich die Markierung auf die benachbarten Schichten (mittleres bis oberes SGS bzw. SO). In medio-lateraler Richtung war die homolaterale Projektion hauptsächlich im lateralen Viertel des Colliculus zu finden, lediglich in den rostralen Schnitten waren auch in der (medio-lateralen) Mitte des tiefen SGS Terminalfelder.

HRP-TMB Markierung

Die Ausbreitung der Markierung im Colliculus nach HRP-Injektion in ein Auge war im Vergleich zu den oben beschriebenen Ergebnissen unvollständig. Die Markierung war beschränkt auf die hintere Hälfte des kontralateralen Colliculus (siehe Kapitel 5.6). In einem Fall, in dem das injizierte Auge stark entzündet war, war die Markierung noch unvollständiger, d.h. auf wenige Schnitte beschränkt. In den Bereichen jedoch, in denen die Markierung zu sehen war, war sie ebenso intensiv wie die autoradiographische Markierung und zeigte eine deutliche Schichtengliederung: Im SO und im tieferen SGS Fasermarkierung, die hauptsächlich medio-lateral gerichtet ist, darüber ein dichter Filz an markierten Fasern, und schliesslich dichte Terminalmarkierung.

3.2.1.2. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Struktur der markierten Boutons

Für die folgende Beschreibung wurden 84 (nach Injektion von HRP ins Auge) eindeutig TMB markierte Boutons ausgewertet (Abb.

6d,e). Davon waren 41 aus dem SZ (ca. 20 - 100 μ m unter der Oberfläche des Colliculus), die anderen aus dem SGS (ca. 100 - 600 μ m). Es sind kleine bis mittelgrosse Boutons, mit einem kleinsten Durchmesser von 0,15 bis 1,5 μ m ($0,7 \pm 0,29$, *). Es konnte kein Zusammenhang zwischen Boutongrösse und Tiefe im Colliculus gefunden werden. Ihre äussere Form ist sehr vielgestaltig: teilweise rund, meist glattrandig, oft aber auch ausgebuchtet. Manche Boutons umgreifen postsynaptische Profile ganz oder teilweise. Im SZ liegen die markierten Boutons oft in Gruppen nebeneinander.

Die retinalen Boutons haben gewöhnlich viele synaptische Vesikel, die fast immer rund sind. Gewöhnlich ist der grösste Teil der markierten Profile ausgefüllt mit dichtgepackten Vesikeln. In nur 6 (von 84) Profilen waren die synaptischen Vesikel nirgends dicht gepackt.

Von den 142 Mitochondrien in den markierten retinalen Boutons konnten 106 als hell und 8 als dunkel klassifiziert werden. Während im SZ ein Grossteil der Profile (29 von 47) keine oder nur 1 Mitochondrion enthielten, hatten im SGS viele Profile (28 von 43) zwei und mehr Mitochondrien (siehe Abb. 9).

In 18 der 84 markierten Boutons (ca. 20%) befanden sich ein bis vier dunkle Vesikel (dense cored vesicles), in 26 Boutons (ca. 30%) waren helle Vesikel, die deutlich grösser als synaptische Vesikel waren, und in der Regel als Anschnitte des glatten endoplasmatischen Reticulums zu deuten sind.

Die meisten markierten retinalen Boutons sind also RI-Terminalen nach VRENSSEN und DE GROOT (1977).

* Mittelwert $\pm$ Standardabweichung

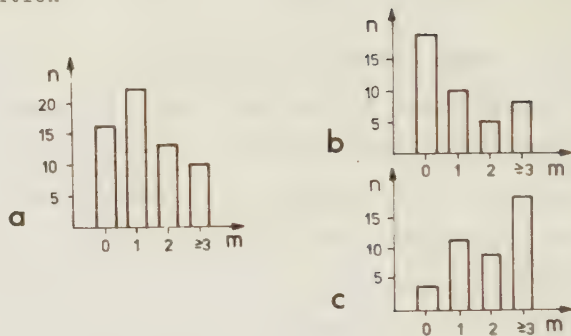


Abb.9

Anzahl der Mitochondrien in markierten Boutons.

n = Anzahl markierter Boutons

m = Anzahl Mitochondrien je Bouton

a. Markierte Boutons nach HRP Injektion im gleichseitigen primären visuellen Kortex.

b und c. Markierte Boutons nach HRP Injektion in das kontralaterale Auge, b im SZ, c im SGS.

Synaptische Beziehungen

Von den markierten Boutons zeigten 40 Synapsen, acht davon mehrere (2 - 4). 19 Synapsen konnten als asymmetrisch klassifiziert werden (14 mit kräftiger, 5 mit schwacher postsynaptischer Verdickung; COLONNIER, 1968) 5 Synapsen sind symmetrisch, die übrigen sind schräg geschnitten und deshalb nicht klassifizierbar.

Es konnten 47 Profile identifiziert werden, die zu den markierten retinalen Boutons postsynaptisch waren. 34 davon sind als eindeutige Dendriten oder als dendritische Spines zu erkennen, obwohl ein Teil davon (9) synaptische Vesikel enthalten. 13 postsynaptische Profile sind Boutons. Diese sind klein, haben viele (meist runde) synaptische Vesikel, enthalten meist kein, höchstens ein Mitochondrion und sind fast alle (ausser 2) im SZ gelegen.

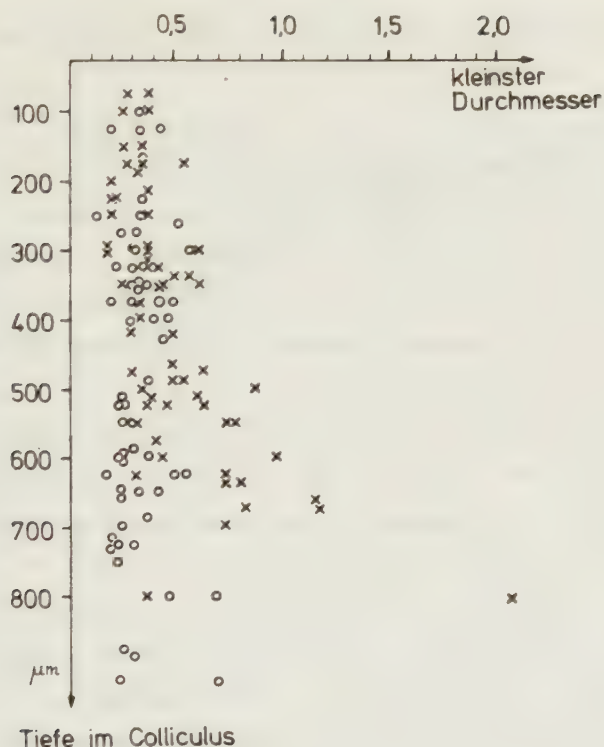


Abb. 12

Größe der markierten myelinisierten Fasern in den verschiedenen Tiefen des Colliculus.

x nach HRP Injektion in das kontralaterale Auge.

o nach HRP Injektion in den gleichseitigen primären visuellen Kortex.

Markierte Fasern

Markierte myelinisierte Axone wurden hauptsächlich im SGS gefunden. Im SZ konnten nur am unteren Rand (in 75 - 100 µm Tiefe) bemerkte retinale Fasern gesehen werden. Die durchschnittliche Größe der Fasern nimmt mit zunehmender Tiefe deutlich zu (Abb. 12). Wiederholt waren RANNVIER'sche Knoten

markiert, einige davon enthielten synaptische Vesikel.

Tiefenverteilung der TMB Markierung

Als Mass für die Ausdehnung der Projektion wurde in einzelnen Schnitten die Häufigkeit der Markierungen und der markierten Profile in den verschiedenen Tiefen des Terminalfeldes bestimmt (Abb. 10). Markierte Boutons wurden zwar von ca. 20 μm bis ca. 600 μm Tiefe gefunden, jedoch mit einer grössten Häufigkeit (ca. 2 Boutons/1000 μm) zwischen 25 und 100 μm Tiefe, also etwa im mittleren und tieferen SZ. In diesem Bereich wurden auch besonders viele Boutons mit Synapsen gefunden (Tab. 2), relativ viele waren auch im oberen Teil des oberen SGS (200 - 300 μm Tiefe), darunter nur noch einzelne. Markierte myelinisierte Fasern wurden zwischen 100 und 800 μm Tiefe gefunden. Es ist kein deutliches Maximum in ihrer Häufigkeit zu erkennen. Im mittleren und tiefen SGS sind jeweils mehr markierte Fasern als Boutons, im tiefen SGS liegen fast alle Markierungen in Myelinscheiden.

Die Häufigkeit aller Markierungen ist erheblich höher, weil dazu auch solche Markierungen mitgezählt wurden, die in einem nicht klassifizierten Profil (z.B. unmyelinisiertes Axon) lagen oder die keinem Profil eindeutig zuzuordnen waren. Da die TMB Markierung jedoch sehr spezifisch ist (Kap. 5.6), kann die Gesamtzahl aller Markierungen als Mass für die Dichte der Projektion (Fasern und Boutons) verwendet werden. Sie hat, mit ca. 8,5 Markierungen je 1000 μm , ein deutliches Maximum im Bereich von 25 - 50 μm Tiefe.

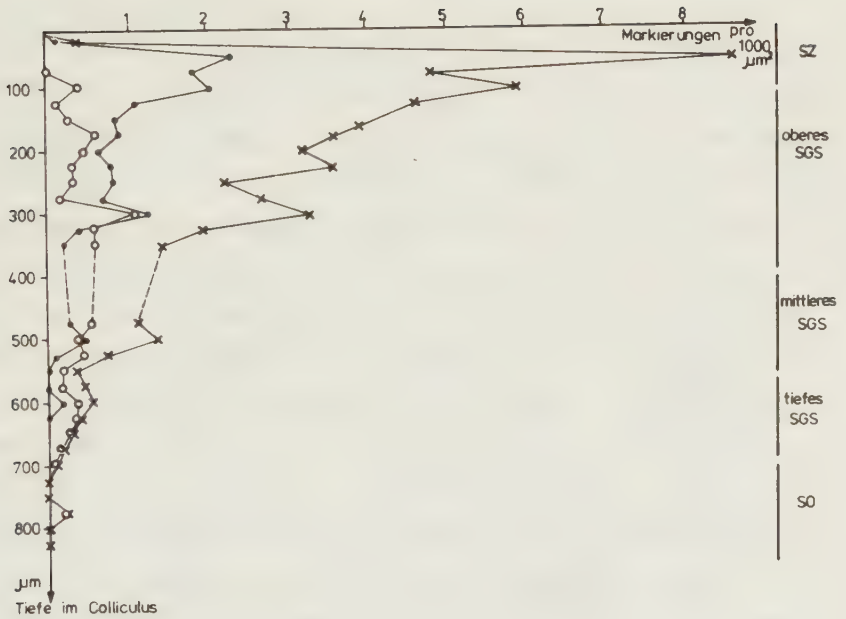


Abb.10

Dichte des (gekreuzten) retinalen Terminalfeldes.

Häufigkeit der TMB Markierung in den verschiedenen Tiefen des Colliculus superior nach HRP Injektion in das kontralaterale Auge.

- × Häufigkeit aller Markierungen
- Häufigkeit von markierten Boutons
- o Häufigkeit von markierten myelinisierten Axonen

3.2.2. Kortikotectale Projektion

3.2.2.1. Lichtmikroskopische Untersuchungen

Degeneration

Nach einer Läsion im primären visuellen Kortex (Area 17 nach BRODMANN, 1909; *) wurden im homolateralen Colliculus degenerierende Fasern und Boutons durch Silberimprägnation dargestellt. Die kortikotectale Projektion ist ausschliesslich homolateral. Entsprechend der eng umgrenzten Läsion und Retinotopie der Projektion war auch das Terminalfeld nur auf einen Teil des Colliculus begrenzt. Degenerierende Fasern waren im SO und im ganzen SGS, nicht jedoch im SZ zu finden. Die imprägnierten Axone bildeten ein lockeres Geflecht, das etwa in der Mitte des SGS am stärksten war. Die Fasern zeigten eine leichte radiale Vorzugsrichtung, waren etwa von mittlerer Dicke, und lagen nie in Bündeln. Auch in seinem Zentrum war das Fasergeflecht lichter als nach Enucleation (Kap. 3.2.1.1.). Degenerierende Boutons waren im ganzen SGS zu finden, vor allem in seinem mittleren und tieferen Teil. Im SZ waren nahezu keine degenerierenden Boutons zu sehen.

Autoradiographie

Die Markierung im Colliculus nach ^3H -Leucininjektion in den Kortex (Abb.8) entspricht im wesentlichen dem Ergebnis

* Da in dieser Arbeit nur diejenige kortikotectale Projektion untersucht wurde, die aus dem primären visuellen Kortex entspringt, werden Worte wie "kortikal" und "kortikotectal" im Text stets in diesem Sinne gebraucht.

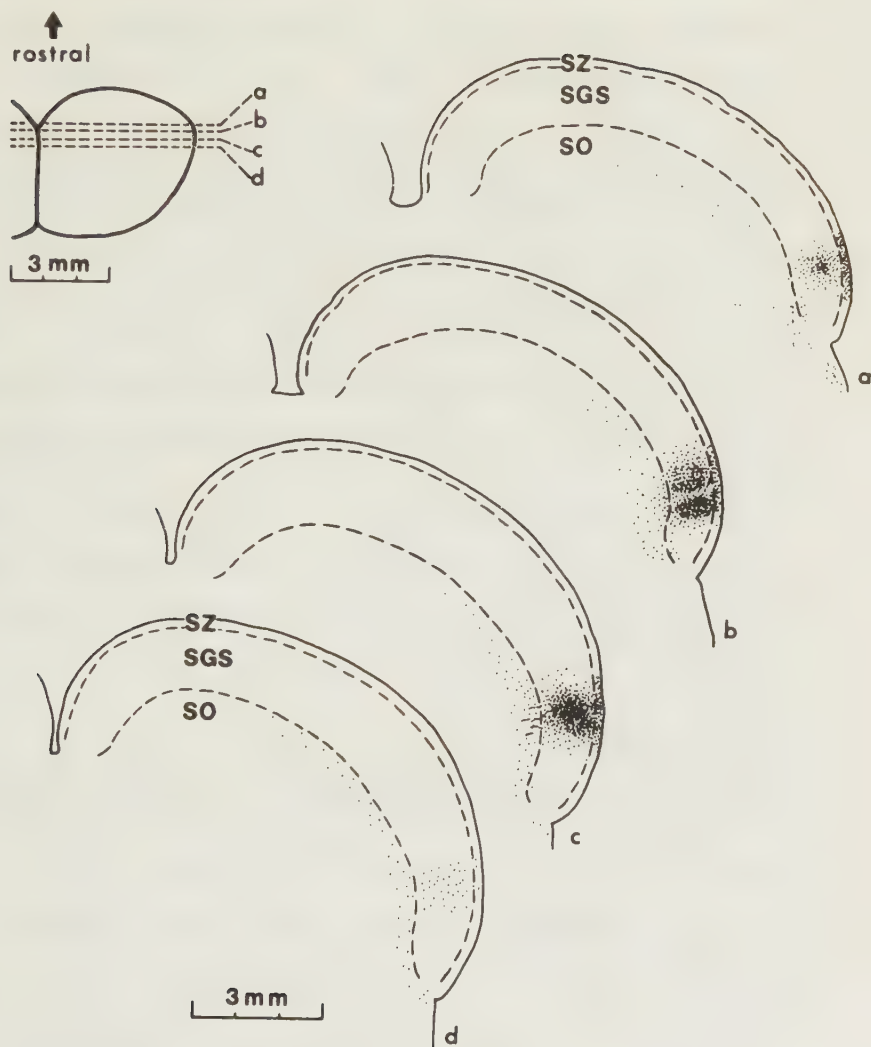


Abb. 8

Kortikotectale Projektion.

Autoradiographieschnitte durch den Colliculus superior nach ^3H -Leucin Injektion in die (gleichseitige) primäre Sehrinde. (Näheres siehe Legende zu Abb. 7)

des Degenerationsexperimentes. Zusätzlich jedoch ist im SZ eine deutliche Markierung zu sehen, die bis zur Oberfläche des Colliculus reicht. Diese Markierung ist zum Teil vom sonstigen Terminalfeld etwas abgesetzt. Ausserdem erstreckt sich ein Band schwacher Markierung im SO von lateral bis etwa zur Mitte des Colliculus.

Die Markierung ist am dichtesten im tiefen und mittleren SGS sowie im unteren Teil des oberen SGS; in dieser Tiefe hat sie auch ihre grösste rostrocaudale und medio-laterale Ausdehnung. Seitlich (lateral bzw. medial) nimmt die Markierung allmählich an Stärke ab. Im Zentrum des Terminalfeldes ist eine Zone schwächerer Markierung (Abb. 8 b). Diese entspricht vermutlich dem Einstichkanal der Kortextinjektion, der eine Läsion im Zentrum des Injektionsgebietes darstellt - von dort aus kann kein Transport des Tracers erfolgen.

HRP-TMB Markierung

Im kortikotectalen System vereinigt die HRP-TMB Methode die Vorteile der beiden oben beschriebenen Techniken. Die Terminalmarkierung entspricht im SGS und SZ der autoradiographischen Markierung (siehe oben). Unterhalb der Terminalmarkierung und lateral davon (z.T. auch medial davon) sind im ganzen SO markierte Fasern, innen vor allem mit medio-lateraler Richtung, darüber (und im tiefen SGS) hauptsächlich mit radialer Richtung. Einzelne Fasern sind auch im darunterliegenden Stratum intermedium markiert (siehe SCHÖNITZER und HOLLÄNDER, 1982, Abb.1 und 2).

3.2.2.2. Elektronenmikroskopische Untersuchung

Struktur der markierten Boutons

Die folgende Beschreibung kortikotectaler Boutons stützt sich hauptsächlich auf 64 eindeutig mit TMB markierte Boutons, die zum Teil in mehreren benachbarten Schnitten fotografiert wurden. Markierte kortikotectale Boutons (Abb. 6 a,b,c) wurden sowohl im SGS als auch im SZ in Tiefen von 25 bis 700 μm gefunden. Sie liegen selten in Gruppen. Wie die retinalen Boutons sind sie klein bis mittelgross (kleinster ϕ 0,2 bis 1,2 μm , $x = 0,63 \pm 0,28 \mu\text{m}^*$). Die kortikotectalen Boutons haben die gleichen äusseren Formen wie die retinotectalen, darüberhinaus gibt es jedoch einige (8 von 64), die auffallend lang und dünn sind (siehe Abb. 6a). Diese enthalten Mikrotubuli, höchstens zwei (dunkle) Mitochondrien und nur auffallend wenige synaptische Vesikel. Sechs dieser 8 Boutons lagen im oberen SGS, einer davon war als Bouton "en passant" zu erkennen. Die anderen kortikalen Boutons haben meistens viele synaptische Vesikel, die gewöhnlich dicht gepackt sind. Boutons, deren Vesikel nirgends dicht gepackt sind, kommen hauptsächlich im oberen SGS und SZ vor. Diese entsprechen möglicherweise Querschnitten der oben beschriebenen "langen dünnen" Boutons, die als solche natürlich nur im Längsschnitt zu erkennen sind. Alle kortikotectalen Boutons haben fast nur runde synaptische Vesikel.

Von 88 Mitochondrien in markierten kortikalen Boutons (Verteilung siehe Abb. 9) konnten 49 als dunkel, 17 als hell klassifiziert werden. Es konnte kein Unterschied in der Anzahl der Mitochondrien in den verschiedenen Schichten gefunden werden.

* Mittelwert $\pm$ Standardabweichung

e", in 15 Boutons (23%) waren helle Vesikel (deutlich grösser als synaptische), in 3 Boutons waren "multivesicular bodies".

Ein Grossteil der markierten kortikalen Boutons (jedoch nicht alle) entsprechen also den RD-Terminalen nach VRENSEN und DE GROOT (1977).

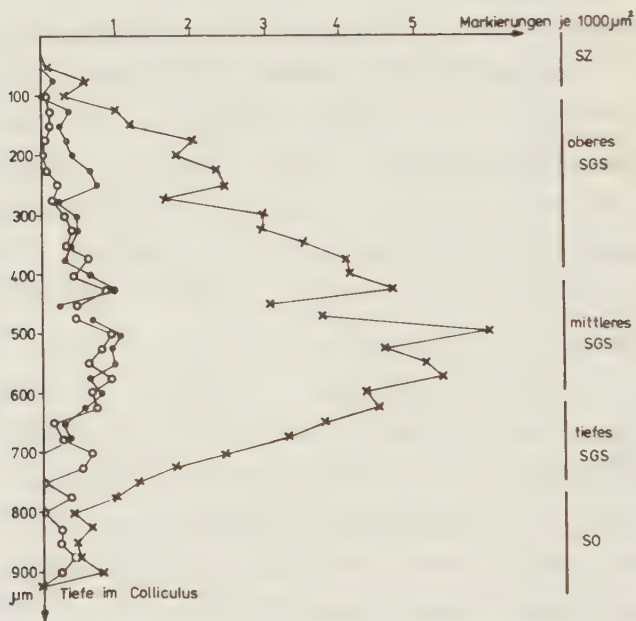


Abb. 11

Dichte des kortikalen Terminalfeldes.

Häufigkeit der TMB Markierung in den verschiedenen Tiefen des Colliculus superior nach HRP Injektion in den gleichseitigen primären visuellen Kortex.

- x Häufigkeit aller Markierungen
- Häufigkeit von markierten Boutons
- o Häufigkeit von markierten myelinisierten Axonen

Synaptische Beziehungen

Von den markierten Boutons hatten 30 Synapsen, 14 davon mehrere (2 - 3). Von den 44 Synapsen konnten 21 als asymmetrisch (9 mit kräftiger, 12 mit schwacher postsynaptischer Verdickung) und 6 als symmetrisch klassifiziert werden. Die postsynaptischen Profile sind entweder dendritische Spines oder Dendriten, von denen knapp die Hälfte einzelne synaptische Vesikel enthält.

Zwei markierte Boutons sind selbst postsynaptisch zu kleinen Boutons mit runden, dichtgepackten Vesikeln, ohne Mitochondrien. Eine der beiden Synapsen ist asymmetrisch, die andere ist schräg geschnitten.

Markierte Fasern

Markierte, bemerkte Fasern wurden im SO und im SGS, sowie im unteren SZ gefunden (Abb. 6f). Ihre durchschnittliche Grösse nimmt im untersuchten Bereich bei zunehmender Tiefe nicht zu (Abb. 12). Wie bei den retinalen Fasern waren oft RANVIER'sche Knoten markiert.

Tiefenverteilung der TMB Markierung

Wie bei der Untersuchung der retinalen Projektion (Kap. 3.2.1.2.) wurde auch die Häufigkeit der Markierungen und der markierten Boutons bzw. Fasern des kortikotectalen Terminalfeldes bestimmt (Abb. 11).

Im SZ sind markierte Boutons hauptsächlich im Bereich von 50 bis 75 μm Tiefe zu finden, (einzelne Boutons auch höher, in 25 - 50 μm Tiefe) im SGS durchgehend bis ca. 700 μm Tiefe, jedoch ohne

deutliches Maximum. Markierte Boutons mit Synapsen wurden im ganzen SGS und im unteren SZ gefunden. Am meisten waren im mittleren SGS (400 - 600 μ m Tiefe, Tab. 2), relativ viele waren auch im oberen SGS (200 - 400 μ m). Markierte Fasern treten im ganzen SGS und im SO auf, am häufigsten im mittleren und tiefen SGS. Die Häufigkeit aller Markierungen hat ein deutliches Maximum im mittleren SGS, hier finden wir auch die meisten Synapsen.

Tiefe im Colliculus [μ m]	markierte retinotectale Boutons	markierte kortikotectale Boutons
0 - 100	10	1
100 - 200	5	2
200 - 300	3	5
300 - 400	0	5
400 - 500	1	7
500 - 600	2	8
600 - 700	1	3
700 - 800	0	1

Tab.2

Anzahl der markierten Boutons mit Synapsen in den vollständig untersuchten Schnitten.

4. DISKUSSION

4.1. Diskussion zum Aufbau der oberflächlichen Schichten des Colliculus superior.

4.1.1. Abgrenzung und Bezeichnung der drei oberflächlichen Schichten.

Die vorliegende Einteilung der Schichten des Colliculus superior (Kap. 3.1) entspricht im wesentlichen der von KATO (1941). Diese ist bei weitem die gründlichste Beschreibung des Colliculus superior beim Kaninchen, und es ist zu bedauern, dass sie in der neueren neuroanatomischen Literatur weder zitiert noch diskutiert ist. Anstatt jedoch wie KATO die Schichten zu nummerieren, bevorzugte ich die eingebürgerten Namen (SZ, SGS und SO), die ich in der gleichen Bedeutung wie MATHERS (1977c) und GEERAEDTS (1978) verwendete (Abb. 13).

KOELLIKER (1896) sowie WINKLER und POTTER (1911) grenzen die dünne oberflächennahe Faserschicht ("mittleres SZ", Kap. 3.1.1) als W1 (KOELLIKER, 1896) bzw. SZ (WINKLER und POTTER, 1911) vom darunterliegenden gr1 bzw. SGS ab. Dies entspricht dem eigentlichen Wortsinn des Stratum zonale als oberflächliches Mark. Es wurde (beim Menschen) erstmalig durch MEYNERT (1872) beschrieben und "Gürtelschichte" genannt. Der Terminus "Stratum zonale" wurde von TARTUFERI (1884) vom Stratum zonale thalami auf den Colliculus übertragen. Man könnte demnach das "mittlere SZ" (Kap. 5.1.1) auch "Stratum zonale sensu stricto" nennen (entsprechend "stratum zonale proper" nach LUND, 1972a beim Rhesusaffen). GEERAEDTS (1978) erwähnt die Fasern des SZ nicht. MATHERS (1977c) gibt an, dass sie 70 - 90 µm unter der Oberfläche

			1				oberes
w ₁	SZ	I	2	SZ	SZ	SZ	mittl.
			3				tiefes
gr ₁	outer	II	1 _α	SGS	SGS upper	SGS super-ficial	oberes
			2				mittl.
	inner		3	SMS äußeres	lower	deep	tiefes
w ₂	SMS	III		SMS inneres	SO	SO	SO
Kölliker 1896	Winkler & Potter 1911	Kato 1941	Gerhard 1968	Mathers 1977 c	Geeraedts 1978	Schönitzer 1982	

Abb.13

Vergleich der Gliederung der oberflächlichen Schichten des Colliculus superior beim Kaninchen nach verschiedenen Autoren.

liegen. Die Diskrepanz zu den vorliegenden Ergebnissen (Kap. 3.1.1) könnte daher kommen, dass die von MATHERS (1977c) verwendeten Schnitte schräg zur Oberfläche geschnitten waren.

Mehrfach (WINKLER und POTTER, 1911; MATHERS, 1977c; GEERAEDTS, 1978) wurde das SGS in eine höhere und eine tiefere Unterschicht eingeteilt. Dem steht die Einteilung in drei Unterschichten (Kap. 3.1.2 und KATO, 1941) gegenüber, die mir jedoch gerechtfertigt erscheint, da sie regelmässig und im ganzen Colliculus zu erkennen ist. Eine weitere Unterteilung des oberen SGS in zwei Zonen II1_α und II1_β, KATO, 1941) erscheint mir demgegenüber nicht so eindeutig und charakteristisch. Die Einteilung des SGS in drei Unterschichten wird indirekt auch von anderen Autoren unterstützt: GERHARD (1968), erwähnt in ihrer Beschreibung neben dem "oberen SGS" (Kap. 3.1.3) auch das "mittlere SGS" (Kap. 3.1.2) (".... schmale nervenzellärmere und gliareiche Zone"), auch wenn sie es nicht benennt. Das "tiefere SGS" (Kap. 3.1.2) bezeichnet GERHARD als "äusseres Stratum medullare superficiale" (siehe Abb. 13). Das "innere

Stratum medullare superficiale" nach GERHARD entspricht dem SO (Kap. 3.1.3). Das "upper SGS" nach MATHERS (1977) entspricht dem "oberen SGS", sein "lower SGS" dem "tiefen und mittleren SGS". Das "superficial SGS" nach GEERAEDTS (1978) jedoch entspricht dem "oberen und mittleren SGS", das "deep SGS" dem "tiefen" (siehe Abb. 13).

Nach MATHERS (1977c) sind die Fasern des SO hauptsächlich medio-lateral gerichtet. Dass ihre Hauptrichtung jedoch rostro-caudal ist, sieht man sowohl in den Transversal- als auch in den Flachschnitten (Abb. 3).

4.1.2. Vergleich mit anderen Tieren

Nach der grundlegenden Arbeit von TARTUFERI (1884) über den Colliculus des Menschen hat FRANKI-HOCHWART (1902) den Colliculus der Blindmaus mit dem von verschiedenen Säugern verglichen und die ältere Literatur diskutiert. HUBER und CROSBY haben die Literatur 1943 referiert. An neueren Arbeiten ist vor allem die detaillierte Beschreibung des Colliculus superior der Katze von KANASEKI und SPRAGUE (1974) zu erwähnen sowie verschiedene kürzere: Ratte: KATO, 1941b; ZEMAN und INNES, 1963; LUND, 1969, 1972b; Schwein: FREUND, 1969a, 1969b; Meerschweinchen: FREUND, 1969c; Rhesusaffe: LUND, 1972a; Tupaia: HARTING et al., 1973; GRAHAM und CASAGRANDE, 1980; Schimpanse: TIGGES und TIGGES, 1975; Grauhörnchen: ROBSON und HALL, 1976. Bei all den verschiedenen untersuchten Arten ist die grundlegende Gliederung in SZ, SGS und SO die gleiche, sie scheint also für die Säugetiere allgemein gültig zu sein. In einigen Fällen (GANSER, 1882; FREUND, 1969c; LUND 1969, 1972b; GEERAEDTS, 1978) wurden die Fasern des SZ nicht gesehen, oder aber lediglich nicht

erwähnt. Eine Einteilung des SGS in drei Unterschichten wurde für verschiedene Säuger beschrieben (Katze: KANASEKI und SPRAGUE, 1974; Ziege: KATO, 1941a; verschiedene Nager, Ungulaten, Carnivoren und Primaten: YOSHIDA, 1957; Fledermaus: COTTER, 1981).

Trotz der gleichen grundlegenden Gliederung sind die Schichten in ihrem feineren Aufbau (soweit man ihn anhand der Literatur vergleichen kann) verschieden. Zwar ist das SGS der Katze nach KANASEKI und SPRAGUE (1974) ebenso wie das SGS des Kaninchen in drei Unterschichten gegliedert, aber mit deutlich anderen Merkmalen. Ausserdem sehe ich beim Kaninchen keine Zellschicht, die der Schicht I2 der Katze (KANASEKI und SPRAGUE, 1974) entsprechen könnte.

4.1.3. Diskussion zur Ultrastruktur des Neuropils

Die vorliegende Beschreibung der Ultrastruktur des Neuropils des Colliculus superior (Kap. 3.2) bestägt und ergänzt die früheren Arbeiten von MATHERS (1977c) und VRENSSEN und DE GROOT (1977). Der wichtigste Unterschied zu den früheren Arbeiten ist die genaue Beachtung der verschiedenen Tiefenstufen in Übereinstimmung mit der IM Schichtengliederung. Die vorliegende Beschreibung entspricht den früheren hauptsächlich in Bezug auf das tiefe SZ und das obere SGS. Insbesondere konnten die von VRENSSEN und DE GROOT (1977) beschriebenen Boutontypen wiedergefunden und bestätigt werden, und ihre Häufigkeit in den verschiedenen Schichten beschrieben werden. Dabei bewährte sich die Verwendung der gleichen Perfusionslösungen (jeweils nach PETERS, 1970), da sie die Form der synaptischen Vesikel

beeinflusst (VAIDIVIA, 1971).

Überraschend war in der vorliegenden Untersuchung die grosse relative Häufigkeit symmetrischer Synapsen im tiefen SGS. Nach MATHERS (1977c) ist die absolute Anzahl der symmetrischen Synapsen bei 400 und 500 μ m Tiefe (also etwa im mittleren SGS) am grössten, dass ihre relative Häufigkeit jedoch am grössten im tiefen SGS ist, entspricht der geringen Anzahl assymmetrischer Synapsen in dieser Stufe.

In Übereinstimmung mit MATHERS (1977c) fand ich im oberen SGS präsynaptische Dendriten. VRENSSEN und DE GROOT erwähnen diese nicht, es scheint, dass sie diese zu den P-Terminalen zählen, dies geht auch aus ihrer Abb. 9 hervor. Daneben gibt es aber einen zweiten Typ von P-Terminalen, der auch in den tieferen Schichten auftritt. Präsynaptische Dendriten sind hauptsächlich vom Thalamus bei verschiedenen Tieren bekannt (FAMIGLIETTI und PETERS, 1972; RAISTON und HERMANN, 1969; RINVIK, 1972; RAMON-MOLINER, 1975; HAMORI et al., 1975), wurden aber auch im Colliculus superior bei Ratten (LUND, 1969) und Affen (LUND 1972A; VALVERDE 1973; TIGGES und TIGGES, 1975) beschrieben.

4.2. Räumliche Verteilung der untersuchten Afferenzen.

4.2.1. Ausdehnung der untersuchten Terminalfelder

Die vorliegenden Ergebnisse (Kap. 3.2) ergeben durch die parallele Verwendung dreier verschiedener Techniken (Degeneration, Autoradiographie, HRP-TMB Markierung) ein umfassenderes Bild von der retinotectalen und kortikotectalen Projektion als frühere Untersuchungen, die stets nur eine Methode verwendeten (Degeneration: GIOIII und GUTHRIE, 1967, 1969, 1971;

GIOIII und POPE 1971; Autoradiographie: HOLLÄNDER et al., 1979; GIOIII et al., 1978; KARISSON und SJÖSTRAND, 1972). Die retinotectale Projektion konnte im (Degenerationsexperiment und durch Autoradiographie) in ihrer ganzen Ausdehnung dargestellt werden. Dadurch konnte ihre unterschiedliche Ausprägung in den verschiedenen Teilen des Colliculus beschrieben und miteinander verglichen werden. Die in Abb. 10 dargestellte Tiefenverteilung der Markierung nach Augeninjektion stammt aus der hinteren Hälfte des Colliculus. Anhand der LM Ergebnisse kann man davon ausgehen, dass sie im vorderen Teil des Colliculus zwar nicht grundsätzlich anders aussehen würde, dass aber das Maximum der Markierung nicht ganz so scharf auf die obersten 100 µm beschränkt wäre. Von der kortikotectalen Projektion konnte stets nur ein Terminalfeld dargestellt werden, das einem Ausschnitt der gesamten Projektion entspricht. Da aufgrund der Operationstechnik stets etwa im gleichen Gebiet des Kortex injiziert wurde, lag das Terminalfeld immer in der lateralen Hälfte des Colliculus, meistens im vorderen lateralen Teil. Die vorliegende Beschreibung bezieht sich deshalb nur auf diesen Teil der gesamten kortikotectalen Projektion. Es ist nicht auszuschliessen, dass sie sich in anderen Teilen des Colliculus davon unterscheidet. Um dies zu untersuchen müsste man z.B. gezielt in verschiedenen Teilen des primären visuellen Kortex injizieren. Insgesamt zeigt sich folgende räumliche Verteilung:

1. Die gekreuzten retinocolliculären Fasern enden im ganzen kontralateralen Colliculus. Die intensivste Markierung ist im SZ und im darunterliegenden oberen SGS. Im vorderen und lateralen Teil des Colliculus ist die Markierung etwas stärker als hinten und medial.
2. Die ungekreuzten retinocolliculären Fasern enden in einzelnen kleinen Terminalfeldern im tiefen SGS des vorderen lateralen

Teils des Colliculus.

3. Die kortikalen Fasern enden im SGS und SZ des gleichseitigen Colliculus, die stärkste Markierung ist im mittleren SGS (sowie im unteren Teil des oberen SGS, und im tiefen SGS). Es gibt keine kontralaterale kortikotectale Projektion.

Dass die Markierung im vorderen-lateralen Teil des Colliculus besonders stark ist, könnte durch passierende Fasern verursacht sein, da die retinalen Axone von vorne in den Colliculus einstrahlen. Dies dürfte zwar für die Markierung im SO zutreffen, aber kaum für die Markierung im SGS/SZ.

Der vordere-laterale Teil des Colliculus wird besonders stark von der Retina innerviert, hier liegen die Terminalfelder der ipsilateralen Projektion und sind die kontralateralen besonders stark. Nach den Ergebnissen von BROUWER (1923), ÖKI (1968), und HUGHES (1971) sind die Ursprungszellen für die (gekreuzte) retinale Projektion in diesen Teil des Colliculus im temporalen oberen Quadrant der Retina. Dieser entspricht einer Blickrichtung nach vorne - unten, also dem unteren Teil des binokulären Gesichtsfeldes. In diesem Teil der Retina beschrieb PROVVIS (1979) ein Gebiet mit besonders vielen grossen Ganglienzellen das er "large cell node" nennt, und von dem er vermutet, dass es funktionell einer Area centralis entspricht. Diese Vermutung wurde durch eine neuere Arbeit (PROVIS und WATSON, 1981) erhärtet, in der durch Sektion des optischen Traktes bzw. HRP Injektion in den Tractus opticus gezeigt wurde, dass Ganglienzellen die ipsilateral projizieren nur im temporalen (oberen) Teil der Retina vorkommen. Die vorliegenden Ergebnisse unterstützen die Theorie von der Bedeutung des 'large cell nodes', und zeigen darüberhinaus, dass die ipsilaterale retinotectale Projektion der selben Retinotopie folgt wie die

kontralaterale Projektion.

4.2.2. Tiefenverteilung der untersuchten Projektionen

Die oberflächlichen Schichten des Colliculus können nicht nur morphologisch voneinander unterschieden werden, sondern sie unterscheiden sich auch funktionell, da sie unterschiedliche Afferenzen erhalten.

SZ

MATHERS (1977c) fand bei seiner EM-Degenerationsuntersuchung keine kortikotectalen Boutons und nur relativ wenige retinotectale Boutons im SZ. Diese Tiefenverteilung entspricht zwar den Ergebnissen der IM-Degenerationsuntersuchungen (Kap. 3.2.1.1 und 3.2.2.1; GIOILI und GUTHRIE, 1968, 1971), aber nicht den Ergebnissen mit den neueren Methoden (Autoradiographie, HRP-TMB). Diese Befunde konnten mit der TMB Methode im EM bestätigt werden (Abb. 11). Das Vorhandensein einer kortikotectalen Projektion im SZ konnte zwar zweifelsfrei gezeigt werden, aber dennoch dominiert im SZ die retinale Affferenz, die gerade hier ihr Maximum hat: Im SZ waren etwa 10mal so viele Markierungen nach Augeninjektion als nach Kortexinjektion (vergl. Abb. 10 und 11). Dem entspricht auch, dass im Normalmaterial überwiegend RI-Terminalen und nur vereinzelt RD-Terminalen zu finden sind. (Siehe Kap. 4.3 zur Korrelation zwischen retinalen Boutons und RI-Terminalen bzw. kortikalen Boutons und RD-Terminalen.)

Verschiedentlich wurde vermutet, dass die myelinisierten Fasern des (mittleren) SZ retinalen, bzw. kortikalen Ursprungs sind (Literatur siehe HUBER und CROSBY, 1943; ZEMAN und INNES, 1963). Da ich jedoch weder nach Augeninjektion noch nach Kortexinjektion eine TMB Markierung in einem myelinisierten Axon im mittleren SZ fand, ist dies nicht anzunehmen.

SGS

Im oberen SGS sind beide Projektionen etwa gleich intensiv, die retinotectale nimmt von oben nach unten ab, während die kortikotectale zunimmt (Abb. 10, 11). Im mittleren SGS ist die kortikale Afferenz dominierend und die retinale nur schwach. Im tiefen SGS schliesslich ist sowohl die (kontralaterale) retinale als auch kortikale Projektion schwach. Im vorderen lateralen Teil des Colliculus überlappen jedoch hier alle 3 untersuchten Projektionen (die gekreuzte und ungekreuzte retinale und die kortikale Projektion), aber alle sind nur schwach. Dementsprechend findet man im Normalmaterial im oberen SGS viele RI- und RD-Terminalen im mittleren und tiefen SGS hauptsächlich RD- und wenig RI-Terminalen. Die Sonderstellung des tiefen SGS zeigt sich auch im ungewöhnlich hohen Prozentsatz symmetrischer Synapsen.

GRAHAM et al. (1981) haben die Rezeptorfeld Eigenschaften einzelner Zellen im Colliculus untersucht und dabei gezeigt, dass sich die Zellen des oberen und mittleren SGS von denen des tiefen SGS unterscheiden. Dies bestätigt, dass das SGS auch physiologisch keine einheitliche Zellschicht darstellt, sondern gegliedert ist. Auch TAKAHASHI et al. (1977) und TAKAHASHI und OGAWA (1978) berichten, dass sich die intrazellulären Ableitungen (nach Stimulation im optischen Chiasma bzw. im visuellen Kortex)

im SZ und oberen SGS von denen im unteren Teil des SGS unterscheiden. Ein weiterer Hinweis ist die Untersuchung von OKADA (1974) in der gezeigt wird, dass die Konzentration von GABA (-aminobuttersäure) im SZ und oberen SGS relativ hoch ist und zum SO hin abnimmt, die GABA Konzentration ist also dort am höchsten, wo die meisten retinalen Boutons sind. Da jedoch nicht anzunehmen ist, dass die retinalen Terminalen selbst GABA als Transmitter haben (OKADA, 1974), könnte man eher vermuten, dass der hohe GABA Spiegel auf intracolliculäre Neurone zurückzuführen ist, die zur retinalen Afferenz postsynaptisch sind.

4.2.3. Zur Überlappung des retinalen und kortikalen Terminalgebietes im Colliculus superior

Im Gegensatz zur bisherigen Meinung zeigt die vorliegende Untersuchung (Kap. 3.2.), dass sich die retinalen und kortikalen Afferenzen im Colliculus nur zum Teil überlappen. Es wurde gezeigt, dass einerseits retinale Boutons synaptischen Kontakt zu anderen axonalen Profilen machen und andererseits, dass kortikale Boutons auch postsynaptisch sein können. Hieraus ergibt sich die Möglichkeit, dass die beiden Projektionen in direkter synaptischer Verbindung stehen könnten. Die Existenz einer solchen Verschaltung könnte u.U. durch Kombination der TMB-EM Methode (Kortexinjektion) mit anterograder Degeneration (Enucleation) erbracht werden.

Da sich die retinotectale und die kortikotectale Projektion hauptsächlich im oberen SGS überlappen, ist ein gegenseitiger Einfluss der beiden Afferenzen am ehesten in dieser Schicht zu erwarten. SIGI (1981) untersuchte durch einseitige Enucleation

den Einfluss der retinalen auf die Entwicklung der kortikalen Projektion: er fand eine - allerdings geringe - Beeinflussung. Seine Daten könnten u. U. deutlicher sein, wenn er gezielt das obere SGS untersucht hätte. Andererseits erklärt die neue Erkenntnis, dass sich die beiden Projektionen nur teilweise überlappen, weshalb die von SIGI untersuchte Beeinflussung nicht stärker ist.

Verschiedene Autoren (HUGHES, 1971; MASIAND et al., 1971, STEWART et al., 1973) haben in elektrophysiologischen Untersuchungen keinen oder nur einen geringen Einfluss der kortikalen Projektion auf die retinale gefunden. Die weitgehende Trennung der retinalen und kortikalen Terminalgebiete könnte diese Ergebnisse zumindest teilweise erklären. Es ist denkbar, dass man andere Ergebnisse finden könnte, wenn man gezielt das obere SGS untersuchen würde.

4.2.4. Vergleich mit anderen Tieren

Sowohl die retinotectalen Projektionen als auch die kortikotectale Projektion sind bei vielen Säugern untersucht, am besten jedoch bei der Katze bekannt (GAREY et al. 1968; KAWAMURA et al., 1974; GRAYBIEI, 1975; HARTING and GUILLERY 1976; UPDYKE, 1977; WEBER et al., 1978; BEHAN, 1980, 1981). Die ipsilaterale kortikotectale Projektion gleicht in ihrer Form und Intensität der beim Kaninchen, am stärksten ist auch hier die Markierung im mittleren SGS (BEHAN, 1980). Die Diskontinuität der Markierung zwischen SZ und SGS ist bei der Katze noch stärker (UPDYKE, 1977) als beim Kaninchen. Bei der Katze kennt man (im Gegensatz zum Kaninchen) zusätzlich zur ipsilateralen eine

kontralaterale kortikotectale Projektion (POWELL, 1976).

Die kontralaterale retinotectale Projektion hat auch bei der Katze ihren Schwerpunkt im SZ bzw. im obersten Teil des SGS (BEHAN, 1981). Die ipsilaterale (retinotectale) Projektion ist bei der Katze erheblich stärker ausgeprägt und zudem höher (im mittleren SGS) gelegen als beim Kaninchen. Dies könnte dem besseren binokulären Sehen der Katze entsprechen. Trotz der grossen Ähnlichkeit in der Morphologie der Terminalfelder unterscheiden sich die retinotectalen Projektionen bei der Katze von denen beim Kaninchen physiologisch erheblich (STEWART et al., 1973; VANEY et al., 1981).

Bei einer Reihe anderer Säuger sind die retinalen Projektionen und die kortikale, soweit man dies aus der Literatur entnehmen kann, im wesentlichen wie bei Kaninchen und Katze: Hamster (RHOADES, 1981; FROST und SCHNEIDER, 1979; Ratte (LUND, 1972; LUND et al., 1980) Maus (DRÄGER und HUBEL 1975), Fledermaus (COTTER und PIERSON PENTNEY, 1979; COTTER, 1980), Opossum (SANDERSON et al., 1978; HAIGHT, 1980), und Tupaia (GRAHAM und CASAGRANDE, 1980). Die (gekreuzte) retinale Projektion beim Spitzhörnchen hat ein Maximum im oberen SGS/SZ, das erheblich breiter ist als beim Kaninchen. Ausserdem ist beim Tupaia die retinale Projektion erheblich intensiver als die kortikale was auch für die Ratte (LUND 1969) und Maus (VAIVERDE, 1973) gilt. Variabel ist bei den verschiedenen Arten insbesondere die Intensität und Lage der ipsilateralen retinotectalen Projektion, von der man annimmt, dass sie phylogenetisch jünger ist als die gekreuzte Bahn (RODIECK, 1969), und die für das binokuläre sehen wichtig zu sein scheint, also von der Lebensweise der Tiere abhängt: Während die ipsilaterale Projektion beim Kaninchen einer Blickrichtung nach vorne

entspricht (4.2.1.) ist sie bei der Maus im Colliculus hauptsächlich medial gelegen (DRÄGER und HUBEI, 1975), und entspricht einer Blickrichtung nach vorne und oben. Dies entspricht der unterschiedlichen Lage der Augen im Kopf, und dem unterschiedlichen binokulären Gesichtsfeld von Kaninchen und Maus. Stets jedoch ist die ipsilaterale retinale Projektion nur in einem Teil des Colliculus und bildet einzelne kleine Terminalfelder im mittleren oder tiefen SGS.

Deutlich anders als beim Kaninchen sind die retinotectalen und die kortikotectale Projektion bei den Primaten (IUND, 1972a; HUBEI und WIESEL, 1975; OGREN und HENDRICKSON, 1976; GRAHAM et al., 1979; POIACK und HICKEY, 1979; TIGGES und TIGGES, 1981). Die kortikotectale Projektion bei Primaten ist am dichtesten im oberen SGS, die ungekreuzte Sehbahn ist ähnlich stark ausgeprägt wie die gekreuzte, und beide bilden ein diskontinuierliches "fleckiges" Muster, ähnlich wie bei anderen Säugern die ipsilaterale retinale Projektion.

4.3. Zur Ultrastruktur der retinalen und kortikalen

Axone und ihrer Boutons.

Die herausragenden gemeinsamen Merkmale der markierten retinalen und kortikalen Boutons sind, dass sie gewöhnlich viele runde synaptische Vesikel enthalten und asymmetrische Synapsen bilden. Die retinalen Boutons sind darüberhinaus meistens durch helle Mitochondrien gekennzeichnet (RI-Terminalen), die kortikalen durch überwiegend dunkle Mitochondrien (RD-Terminalen). Diese Befunde stehen im Einklang zu früheren EM Degenerationsuntersuchungen (MATHERS, 1977a, b, c). Es scheint

mir jedoch wichtig, darauf hinzuweisen, dass keineswegs alle markierten Boutons diesem Schema entsprechen, dass es z.B. durchaus einzelne markierte Boutons mit symmetrischen Synapsen gibt, oder einzelne retinale Boutons mit dunklen, und kortikale Boutons mit hellen Mitochondrien. Unter den kortikalen Boutons gibt es zusätzlich eine Gruppe, die "langen dünnen" Boutons, die sich vor allem durch ihre Vesikelarmut und durch Mikrotubuli von den R-Terminalen unterscheiden. Es scheint mir wahrscheinlich, dass es sich dabei i.d.R. um Boutons "en passant" handelt. Die retinalen Boutons liegen im Gegensatz zu den kortikalen häufig in Gruppen, was auch MATHERS (1977c) beschrieben hat.

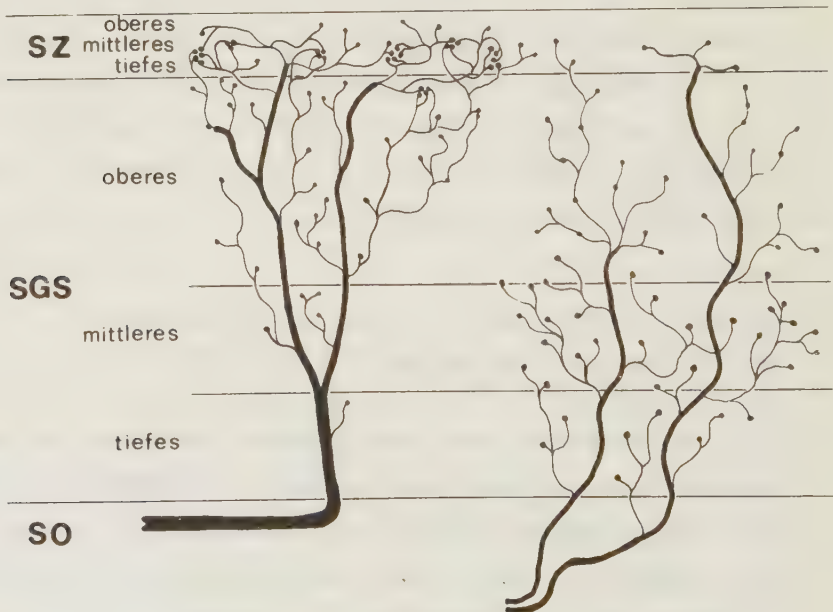


Abb. 14

Hypothetische, idealisierte Axonbäume.

links: retinales Axon (aus dem kontralateralen Auge)

rechts: kortikales Axon (aus der primären Sehrinde)

Insgesamt kann man aus den vorhandenen Daten je einen hypothetischen, idealisierten Axonbaum rekonstruieren (Abb. 14), wobei folgende Befunde zum Ausdruck kommen:

1. Tiefenverteilung der Markierung und Lage ihrer Maxima.
2. Retinale Boutons liegen häufig in Gruppen (wobei man nicht notwendigerweise annehmen muss, dass - wie in Abb. 14 - die Boutons ein und desselben Axons Gruppen bilden).
3. Das Vorhandensein von Boutons en passant bei kortikalen Axonen.
4. Der Durchmesser der myelinisierten retinalen (nicht der kortikalen) Fasern nimmt nach unten zu.
5. Die retinalen Axone verlaufen höher im SO als die kortikalen (MATHERS, 1977a).

Die Ultrastruktur der retinalen und kortikalen Boutons ist bei den verschiedenen bisher untersuchten Arten ähnlich: Halbaffe (TIGGES et al., 1973), Maus (VALVERDE, 1973), Ratte (LUND, 1969), Rhesusaffe (LUND, 1972a), Katze (STERLING, 1971; BEHAN, 1980, 1981) und Spitzhörnchen (GRAHAM und CASAGRANDE, 1980). Die retinalen Boutons enthalten meistens helle Mitochondrien, viele runde Vesikel und bilden asymmetrische Synapsen. Lediglich BEHAN (1981) kann in ihrem Material nicht zwischen hellen und dunklen Mitochondrien unterscheiden. Die kortikalen Boutons haben im Unterschied dazu (soweit untersucht) dunkle Mitochondrien. BEHAN (1981) zeigte, dass die retinalen Boutons mit zunehmender Tiefe auch an Grösse zunehmen. Dies konnte im vorliegenden Material nicht gezeigt werden, u. U. weil nicht genügend Boutons vermessen wurden. Wohl aber konnte ein Unterschied zwischen den oberflächennahen und tieferen Boutons in der Anzahl ihrer Mitochondrien gezeigt werden, was vielleicht einem Grössenunterschied entsprechen könnte.

Festzuhalten bleibt jedoch, dass es sowohl bei der Katze als auch beim Kaninchen unterschiedliche retinale Boutons in den verschiedenen Schichten gibt. ITOH et al. (1980) zeigten bei der Katze, HOFBAUER und DRÄGER (1981) bei der Maus dass Ganglienzellen verschiedener Grössenklassen in den oberen bzw. unteren Teil des SGS projizieren.

Da beim Kaninchen fast alle retinalen Ganglienzellen in den Colliculus projizieren, und ausserdem etwa $2/3$ in den Thalamus (VANEY et al. 1981a), müssen die Axone Kollateralen bilden, die einerseits in den Colliculus und andererseits in den Thalamus projizieren. Aus diesem Grunde kann man vermuten, dass die retinalen Boutons im Geniculatum eine ähnliche Morphologie haben wie die im Colliculus. Es gibt jedoch nur eine kurze Beschreibung degenerierender retinaler Boutons im Geniculatum des Kaninchens (RALSTON und CHOW, 1973), die keinen ausreichenden Vergleich zur vorliegenden Untersuchung zulässt. Im Geniculatum der Katze jedoch gelten Boutons mit runden Vesikeln und hellen Mitochondrien als retinal (GUILLERY, 1969).

5. A N H A N G

M E T H O D I S C H E U N T E R S U C H U N G

5.1. Einleitung - HRP als anterograder Tracer

Meerrettichperoxidase hat sich in der neuroanatomischen Forschung als guter Tracer bewährt. Die Empfindlichkeit der Methode hängt von verschiedenen Parametern ab, besonders aber von der histochemischen Aufarbeitung und dem verwendeten Chromogen. Das klassische Chromogen ist Diaminobenzidin (DAB) (GRAHAM und KARNOVSKY, 1966), inzwischen wurden viele Modifikationen der ursprünglichen Methode publiziert (Literatur siehe ASCHOFF und SCHÖNITZER, 1982). Die Methode nach MESULAM (1978), in der Tetramethylbenzidin (TMB) als Chromogen verwendet wird, hat sich jedoch als empfindlichste erwiesen (MESULAM und ROSENE, 1979, MORELL et al., 1981), und hat sich insbesondere zum Nachweis von anterograd transportiertem HRP bewährt (Literatur siehe SCHÖNITZER und HOLLÄNDER, 1982). Die TMB Methode wurde bisher nur für lichtmikroskopische Untersuchungen angewendet, da das Reaktionsprodukt für elektronenoptisch unsichtbar gehalten wurde (ADAMS, 1980, 1981; BROADWELL und BRIGHTMAN, 1979). Vor kurzem haben jedoch SAKUMOTO et al. (1980) und STÜRMER et al. (1981) das TMB Reaktionsprodukt im EM zeigen können.

Nachdem sich mehrere DAB Methoden als ungeeignet für die gegebene Fragestellung erwiesen hatten, gelang es, die TMB Methode entsprechend zu modifizieren, dass sie bessere Ergebnisse lieferte als mit den von SAKUMOTO et al. (1980) und STÜRMER et al. (1981) durchgeführten bzw. empfohlenen Parametern. Die neue Technik wurde getestet, und es konnte gezeigt werden, dass sie zur EM Untersuchung von Terminalfeldern geeignet ist.

5.2. Getestete Methoden

Folgende DAB Methoden wurden lichtmikroskopisch getestet: GRAHAM und KARNOVSKY (1966), ADAMS (1977), STREIT und REUBI (1977), MALMGREEN und OISSON (1978) und ITOH et al. (1979). Ausser der letztgenannten (die nur kortikofugal getestet wurde) wurden diese Methoden sowohl im kortikofugalen als auch im retinotektalen System, jede in mindestens 3 Experimenten, getestet. Im EM wurden die Methoden nach STREIT und REUBI (1977), MALMGREEN und OISSON (1978) und ITOH et al. (1979), jeweils im kortikotectalen System, getestet.

Die TMB Methodik basiert auf der Inkubation nach MESULAM (1978). Für IM wurde der Einfluss des Stabilisierungsbades sowie verschiedene Dehydrierungen untersucht. Für EM wurde eine kürzere Inkubationsdauer (5 anstatt 20 min) sowie ein anderer pH-Wert (pH 6 anstatt pH 3,3) getestet.

5.3. Lichtmikroskopische Ergebnisse

DAB

Mit keiner der verschiedenen DAB Methoden konnte eine IM Markierung im Colliculus gefunden werden. Dies gilt auch für jene Versuche, bei denen eine besonders starke Markierung nach TMB Inkubation zu sehen war.

TMB

Nach Reaktion mit TMB war in allen HRP Experimenten eine Terminalmarkierung im Colliculus zu sehen, fast immer war die

Markierung so stark, dass sie sogar mit blossem Auge sichtbar war. Mit dem Mikroskop konnte die Markierung im Durchlicht oder Dunkelfeld untersucht werden. Besonders geeignet erwies sich jedoch das Polarisationsmikroskop, da das TMB Reaktionsprodukt, ähnlich wie Benzidindehydrochlorid (BDHC) (ILLING und WÄSSIE, 1979), optisch aktiv ist. Im Polarisationsmikroskop ist das TMB Reaktionsprodukt leuchtend golden auf dunklem Grund. Terminalmarkierung besteht aus einer Wolke von kleinen bis kleinsten Partikeln, die zum Teil kristallartig oder unregelmässig geformt, zum Teil nahe der IM Auflösungsgrenze sind. Oft traten diese Partikel in Reihen oder perlschnurartig auf, was als Fasermarkierung interpretiert wird (Fig. 2). Die Fasermarkierung war erheblich besser zu sehen als in vergleichbaren autoradiographischen Experimenten (siehe Kap. 3.2.1.1 und Kap. 3.2.2.1). Grosse Kristalle, die hauptsächlich an der Schnittoberfläche oder an Erythrocyten zu finden sind (DIETRICH und WALBERG, 1979; MESUJAM, 1978), sind unspezifisch und können von der Markierung leicht unterschieden werden.

Auch in Semidünnschnitten (von in Kunstharz für EM eingebettetem Material) war die TMB Markierung im Durchlichtmikroskop in Form kleiner dunkler Punkte zu sehen, soweit es sich um Material handelte, das bei pH 3,3 inkubiert worden war. Die optische Aktivität war jedoch nicht mehr zu sehen. Semidünnschnitte von Material, das bei höherem pH (6,0) inkubiert war, zeigten in der Regel keine eindeutige IM Markierung.

5.4. Elektronenmikroskopische Ergebnisse

DAB

Nach HRP Injektion in den visuellen Kortex wurde mit DAB reagiertes Material im EM untersucht. Es wurden viele elektronendichte Strukturen ("gefüllte Vesikel") gefunden, wie sie für anterograd transportiertes HRP bekannt sind: HANSSON, 1973; IA VAIL und IA VAIL, 1974; SOTEIO und RICHE, 1974; TURNER und HARRIS, 1974; NAUTA et al., 1975; REPERANT, 1975; WINFIELD et al., 1975; COIMAN et al., 1976; WALBERG et al., 1976a; WALBERG et al., 1976b; STREIT und REUBI, 1977; AIONSO und ASSENMACHER, 1978; ITAYA et al., 1978; CONDE und CONDE, 1979; SOMOGYI et al., 1979; MIZUNO et al., 1980. In Kontrollschnitten vom gegenüberliegenden Colliculus waren jedoch ähnliche, elektronendichte Vesikel. Um die Methode zu testen wurden bei einem Experiment mit besonders starker TMB Markierung im IM Nachbarschnitt von einem Block, der aus dem Terminalfeld getrimmt war und von einem Kontrollblock vom gegenüberliegenden Colliculus jeweils 5 Ultradünnschnitte untersucht. Von jedem Schnitt wurden "blind" 10 Aufnahmen (Vergrößerung 8000 X) aus dem Neuropil gemacht. In den Bildern aus der Experimentalseite waren 31 elektronendichte Strukturen, die wie HRP-gefüllte Vesikel aussahen, auf der Kontrollseite waren es 17. Dies zeigt, dass die HRP-DAB Markierung für eine ultrastrukturelle Untersuchung dieses Terminalfeldes nicht eindeutig genug ist.

TMB

Inkubation bei pH 6,0, 20 min ergab die besten Resultate. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von SAKUMOTO et al. (1980) und STÜRMER et al. (1981) bildete das TMB Reaktionsprodukt kristalline Aggregate. Diese sehen wie Querschnitte von Bündeln

von Nadeln aus. Diese Bündel verschmelzen manchmal und bilden Gruppen. Der Umriss solcher Bündel ist in der Regel länglich, oft rechteckig. Sie sind etwa 0.2 bis 1.5 μm lang (meistens 0.4 - 0.8 μm) und etwa 0.1 μm breit. Die Nadeln, aus denen die Bündel bestehen, zeigen häufig Diskontinuitäten und haben keine deutliche Grenze. Sie sind etwa so dunkel oder dunkler als Myelin. Manchmal sieht man helle Zwischenräume zwischen den Nadeln und dem Gewebe. Aufgrund der charakteristischen Ultrastruktur können selbst kleine Aggregate des TMB Reaktionsproduktes erkannt und kaum mit irgend etwas verwechselt werden.

Gewöhnlich liegen die Kristallbündel innerhalb von Profilen und enden oft direkt an einer Membran, als hätte diese ein Weiterwachsen der kristallinen Strukturen verhindert, zum Teil jedoch haben die Nadeln offensichtlich Membranen durchstossen. Ich fand die Nadeln nicht in Perikaryen oder Gliazellen, kaum in Dendriten (siehe unten). In 17 untersuchten Kontrollschnitten, in denen insgesamt $8.4 \cdot 10^5 \mu\text{m}^2$ Gewebe untersucht wurde, war das Neuropil absolut frei von jeder Markierung. In Übereinstimmung mit den IM Ergebnissen wurde unspezifische "Markierung" lediglich in perivaskulären Zellen und Erythrozyten gesehen.

In den Schnitten die vollständig untersucht wurden (Kap. 3.2.1.2 und 3.2.2.2) waren unter 1468 fotografierten Markierungen nur 21 uneindeutige; 694 konnten einem Axon oder Bouton zugeordnet werden. Viermal schien die Markierung in einem Dendrit zu liegen: In zwei Fällen wurden Nachbarschnitte an derselben Stelle untersucht, dabei zeigte sich, dass die Markierung Teil einer Gruppe von Bündeln war, die ihren Schwerpunkt in einem Bouton hatte, und zum Teil in den

benachbarten Dendrit "eingewachsen" war.

Da die TMB Nadeln Membranen durchstossen können, ist es oft schwer zu entscheiden, ob zwei Bündel in nebeneinanderliegenden Profilen zwei Markierungen darstellen, oder dies nur vortäuschen. Auch hierüber verschafft die Untersuchung von benachbarten Serienschnitten Klarheit.

Material, das bei pH 3,3 inkubiert war (5 bzw. 20 min), enthielt zwar mehr Markierung als nach Inkubation bei pH 6,0, aber die Kristallbündel bildeten oft grosse Haufen (bis zu 5 μ m Durchmesser). In solchen Fällen konnte die Markierung keinen Profilen zugeordnet werden, da die Membranen zerstört und/oder vom Reaktionsprodukt bedeckt waren (STÜRMER et al., 1981). Ausserdem war die Gewebserhaltung deutlich schlechter als nach Reaktion bei pH 6,0. Schnitte, die 5 min bei pH 6,0 inkubiert waren, enthielten keine Markierung (nur in einem Fall getestet).

5.5 Empfohlene TMB Methode

Die Arbeitsschritte der TMB Methode für licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen sind in einem Blockdiagramm (Abb. 15) zusammengefasst. Die Injektions-, Perfusions- und Schneidetechniken sind in Kap. 2.2 und 2.3 beschrieben.

Die TMB Inkubation für IM erfolgt genau nach MESULAM (1978), das dort empfohlene Stabilisierungsbad wird jedoch ausgelassen. Nach der Inkubation werden die Schnitte zwei bis dreimal in Acetatpuffer (0,01 M, pH 3,3) gewaschen, mit Chromalaun Gelatine aufgezogen, mehrere Stunden oder über Nacht bei Zimmertemperatur luftgetrocknet, in 100% Äthanol (2 X je 10 sec) dehydriert, in Xylol aufgehellt (2 X je 2 - 3 min) und schliesslich mit Eukitt eingedeckt.

Für EM werden folgende Arbeitsschritte empfohlen: Die "Chopper"-Schnitte in Acetat Puffer (0,01 M Na-Acetat-Zitronensäure, pH 6,0; 2 X je 2 min) waschen, 20 min vorinkubieren (Medium wie für Hauptinkubation jedoch ohne H_2O_2)

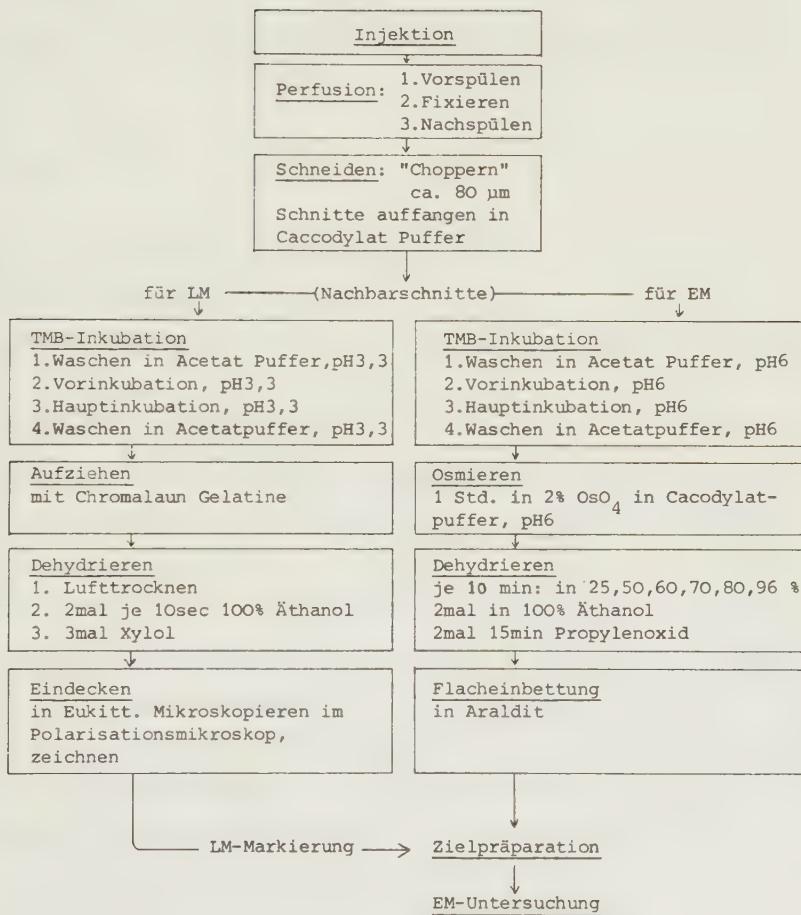


Abb.15

Arbeitsschritte der beschriebenen TMB Methode, zur parallelen licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchung von Terminalfeldern.

und dann 20 min im vollständigen Medium inkubieren (wie von MESULAM (1978) angegeben, jedoch mit 0,01 M Na-Acetat-Zitronensäure Puffer pH 6,0). Anschliessend zwei- bis dreimal (je einige min) in Acetatpuffer (pH 6,0), und einmal in Cacodylatpuffer (0,1 M, pH 6,0) waschen und unmittelbar danach in 2% Osmiumsäure (in 0,1 M Cacodylatpuffer pH 6,0; 1 h) nachfixieren. Nach der Dehydrierung (25, 40, 50, 60, 70, 80, 96 und 2 X 100% Äthanol) werden die Schnitte flach in Araldit eingebettet (Absatz 2.8).

5.6 Diskussion

Der besondere Vorteil der TMB Methode gegenüber der IM Autoradiographie ist, dass man Fasermarkierung besser erkennen kann (CHRONISTER et al., 1980), ausserdem gibt es praktisch keinen "Background" (IAND und LUND, 1979). Insbesondere schwache TMB Markierungen sind - vor allem im Polarisationsmikroskop - sehr gut sichtbar. Die Umgebung der Injektionsstelle, mit ihren hohen HRP Konzentrationen, kann jedoch besser nach Reaktion mit DAB beurteilt werden. Von Nachteil war, dass die retinotectale Projektion nicht vollständig markiert war. Es ist anzunehmen, dass das HRP nur im Bereich nahe der Injektion von den Zellen der Retina aufgenommen und transportiert wurde. Da in den nasalen Teil des Glaskörpers injiziert wurde, entspricht die caudale Lage der TMB Markierung der Retinotopie der Projektion (BROUWER, 1923; ÖKI, 1968; HUGHES, 1971). Bei der Ratte hingegen ist eine vollständige retinotectale Markierung mit TMB möglich (IAND und LUND, 1979; MESULAM und MUFSON, 1980), vermutlich wegen des viel kleineren Augenvolumens.

Der Mangel an eindeutiger IM Markierung in den Semidünnschnitten des für EM eingebetteten Materials (TMB Inkubation bei pH 6,0) könnte an der geringen Grösse der Kristalle liegen. Auch andere Autoren (IA VAIL und IA VAIL,

1974; CONDE und CONDE, 1979; SOMOGYI et al., 1979) haben HRP Markierungen zwar im EM nicht aber im IM gesehen.

Es scheint, dass die Osmierung das TMB Reaktionsprodukt stabilisiert, was für EM die relativ langsame Dehydrierung ermöglicht. Für eine chemische Veränderung des Reaktionsproduktes während der OsO_4 -Fixierung und/oder der EM Einbettung spricht auch, dass das Reaktionsprodukt in Semidünnschnitten nicht mehr optisch aktiv ist. Die Schwierigkeit, HRP - DAB Markierung im EM zu erkennen und von anderen elektronendichten Strukturen zu unterscheiden, wurde auch in anderen Arbeiten erwähnt (IA VAIL 1978, IA VAIL et al., 1980; OSCUIATI et al., 1980). Dasselbe gilt bei Verwendung von Phenylendiamin als Chromogen (RILEY et al., 1981). In den meisten Arbeiten gibt es aber dennoch entweder keine Angaben über DAB positive Strukturen in Kontrollschnitten, oder es wird nur erwähnt, dass es solche gibt (IA VAIL und IA VAIL, 1974, COIMAN et al. 1976). IA VAIL et al. (1980) haben auf der Experimentalseite 3- bis 4mal so viele Axone mit dunklen Vesikeln gezählt als in Kontrollschnitten (nach retrogradem Transport von HRP und DAB Reaktion), bei RILEY et al. (1981) sind es etwa 6mal so viele (nach anterogradem HRP Transport und Phenylendiamin Reaktion). Im oben beschriebenen Experiment waren auf der Experimentalseite nur etwa 1,8mal so viele dunkle Vesikel als in den Kontrollschnitten. Diese Unterschiede können durch die verschiedenen untersuchten Systeme und/oder durch unterschiedliche histochemische Verfahren begründet sein. Die beschriebene TMB Methode führt demgegenüber zu sehr eindeutigen Ergebnissen: es wurde keine Markierung in Kontrollschnitten gefunden. Die Möglichkeit einer falschen Interpretation ist zwar gegeben (siehe die oben beschriebene "dendritische" Markierung),

ist aber nicht häufig, und kann durch Untersuchung von Serienschnitten ausgeschlossen werden.

Andere Methoden zur EM Untersuchung von Terminalfeldern sind die anterograde Degeneration und die EM Autoradiographie. Während bei EM Degenerationsuntersuchungen die untersuchten Strukturen stets pathologisch verändert sind, gibt es keinen Anhalt dafür, dass die mit TMB markierten Axone und Boutons degenerativ verändert sind. MESULAM und MUFSON (1980) haben anterograden Transport von HRP entlang unbeschädigter Axone gezeigt. Ausserdem ist die anterograde Degeneration so langsam, dass man sie bei der verwendeten Überlebenszeit (2 d) noch nicht sehen kann (MATHERS, 1977c). Gegenüber der EM Autoradiographie ist die TMB-EM Methode erheblich einfacher und schneller. Da es ausserdem praktisch keinen "Background" gibt, und da die Markierung im Gewebe ist anstatt über dem Schnitt, ist die TMB Markierung leichter zu interpretieren.

6. VERWENDETE A B K Ü R Z U N G E N

DAB	3,3'-Diamino-benzidin-tetrahydrochlorid
EM	Elektronenmikroskopie, elektronenmikroskopisch
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
IM	Lichtmikroskopie, lichtmikroskopisch
SGS	Stratum griseum superficiale
SO	Stratum opticum
SZ	Stratum zonale
TMB	3,3', 5,5' Tetramethyl-benzidin

7. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- Adams, J.C. (1977) Technical considerations on the use of horseradish peroxidase as neuronal marker, *Neuroscience*, 2: 141-145.
- Adams, J.C. (1980) Stabilizing and rapid thionin staining of TMB-based HRP reaction product, *Neurosci. Lett.*, 17: 7-9.
- Adams, J.C. (1981) Heavy metal intensification of DAB-based HRP reaction product, *J. Histochem. Cytochem.*, 29: 775.
- Alonso, G., and Assenmacher, I. (1978) Electron microscopic study of the orthograde axonal transport of horseradish peroxidase in the supraoptico-neurohypophyseal tract of the rat, *Cell Tissue Res.*, 194: 525-531.
- Andres, K.H. (1965) Der Feinbau des Subfornikalorgans vom Hund, *Z. Zellforsch.*, 68: 455-473.
- Aschoff, A., and Schönitzer, K. (1982) Intraaxonal transport of horseradish peroxidase and its use in neuroanatomy. in: D.G. Weiss und A. Gorio (eds.) 'Axoplasmic Transport in Physiology and Pathology' Springer Verl. Berlin (in Druck)
- Behan, M. (1980) An EM autoradiographic analysis of the corticocollicular projection in the cat, *Soc. Neurosci. Abstr.*, 6: 480.
- Behan, M. (1981) Identification and distribution of retinocollicular terminals in the cat: An electron microscopic autoradiographic analysis, *J. Comp. Neur.*, 199: 1-15.
- Broadwell, R.D., and Brightman, M.W. (1979) Cytochemistry of undamaged neurons transporting exogenous protein in vivo, *J. Comp. Neur.*, 185: 31-74.
- Brodmann, K. (1909) Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde, J.A. Barth, Leipzig.
- Brouwer, B (1923) Experimentell-anatomische Untersuchungen über die Projektion der Retina auf die primären Opticuszentren, Schweiz. Arch. Neurol. Psychiat., 13: 118-137.
- Chronister, R.B., Sikes, R.W., Wood, J., and DeFrance, J.F. (1980) The pattern of termination of ventral tegmental afferents into nucleus accumbens: an anterograde HRP analysis, *Neurosci. Lett.*, 17: 231-235.

- Clark, G. (1978) Tissue preparation and basic staining techniques. In R.T. Robertson (Ed.), Neuroanatomical Research Techniques, Academic press, New York, p.p. 26-45.
- Colman, D.R., Scalia, F., and Cabrales, E. (1976) Light and electron microscopic observations on the anterograde transport of horseradish peroxidase in the optic pathway in the mouse and rat, Brain Res., 102: 156-163.
- Colonnier, M. (1968) Synaptic patterns on different cell types in the different laminae of the cat visual cortex. An electron microscopic study, Brain Res., 9: 268-287.
- Colwell, S.A. (1975) Thalamocortical-corticothalamic reciprocity: A combined anterograde-retrograde tracer technique, Brain Res., 92: 443-449.
- Cotter, J.R. (1981) Retinofugal projections of an echolocating megachiropteran, Americ. J. Anat., 160: 159-174.
- Cotter, J.R., and Pierson Pentney, R.J. (1979) Retinofugal projections of nonecholocating (*Pteropus giganteus*) and echolocating (*Myotis lucifugus*) bats, J. Comp. Neur., 184: 381-400.
- Dietrichs, E., and Walberg, F. (1979) The cerebellar corticonuclear and nucleocortical projections in the cat as studied with anterograde and retrograde transport of horseradish peroxidase. I. The paramedian lobule, Anat. Embryol., 158: 13-39.
- Dräger, U.C., and Hubel, D.H. (1975) Responses to visual stimulation and relationship between visual, auditory, and somatosensory inputs in mouse superior colliculus, J. Neurophysiol., 38: 690-713.
- Famiglietti, E.V., and Peters, A. (1972) The synaptic glomerulus and the intrinsic neuron in the dorsal lateral geniculate nucleus of the cat, J. Comp. Neur., 144: 285-334.
- Fink, R.P., and Heimer, I. (1967) Two methods for selective silver impregnation of degenerating axons and their synaptic endings in the central nervous system, Brain Res., 4: 369-374.
- Frankl-Hochwart v., I. (1902) Zur Kenntnis der Anatomie des Gehirns der Blindmaus (*Spalax typhlus*), Arb. Neurolog. Inst. Wiener Uni., 8: 190-220.
- Freund, E. (1969) Zytoarchitektonik des Mesencephalon und des Pons beim Hausschwein (*Sus scrofa domestica*), Anat. Anz., 125: 345-362.

- Freund, E. (1969) Zytoarchitektonik von Sagittalanseichten des Mesencephalon beim Hausschwein (*Sus scrofa domestica*), Anat. Anz., 125: 539-548.
- Freund, E. (1969) Myeloarchitektonik des Mesenzephalon und des Pons beim Meerschweinchen (*Cavia porcellus* L.), Arch. exper. Vet. Med., 23 H.5: 971-982.
- Frost, D., and Schneider, G.E. (1979) Plasticity of retinofugal projections after partial lesions of the retina in newborn syrian hamsters, J.Comp. Neur., 185: 517-568.
- Ganser, S. (1882) Vergleichend-anatomische Studien über das Gehirn des Maulwurfs, Morpholog. Jhrb., 7: 591-725.
- Garey, I.J., Jones, E.G., and Powell, T.P.S. (1968) Interrelationships of striate and extrastriate cortex with the primary relay sites of the visual pathway, J. Neurol. Neurosurg. Psychiat., 31: 135-157.
- Geeraedts, I.M.G. (1978) An experimental neuro-anatomical study of the primary optic pathways and the descending supra-optic pathways in the rabbit, Thesis, Katholieke Universiteit te Nijmegen, Nijmegen, Netherlands.
- Gerhard, I. (1968) Atlas des Mittel- und Zwischenhirns des Kaninchens, Springer, Berlin.
- Giolli, R.A., and Guthrie, M.D. (1967) Organization of projections of visual areas I and II upon the superior colliculus and pretectal nuclei in the rabbit, Brain Res., 6: 388-390.
- Giolli, R.A., and Guthrie, M.D. (1969) The primary optic projections in the rabbit. An experimental degeneration study, J. Comp. Neurol., 136: 99-126.
- Giolli, R.A., and Guthrie, M.D. (1971) Organization of subcortical projections of visual areas I and II in the rabbit. An experimental degeneration study, J. Comp. Neur., 142: 351-376.
- Giolli, R.A., and Karamanlidis, A.N. (1978) The study of degenerating nerve fibers using silver-impregnation methods. In R.T.Robertson (Ed.), Neuroanatomical Research Techniques, Academic Press, New York, p.p. 211-240.
- Giolli, R.A., and Pope, J.E. (1971) The anatomical organization of the visual system of the rabbit, Doc. Ophthal., 30: 9-31.
- Giolli, R.A., Towns, I.C., Takahashi, T.T., Karamanlidis, A.N., and Williams, D.D. (1978) An autoradiographic study of the projections of visual cortical area 1 to the thalamus, pretectum and superior colliculus of the rabbit, J. Comp. Neurol., 180: 743-752.

- Graham, J., and Casagrande, V.A. (1980) A light microscopic and electron microscopic study of the superficial layers of the superior colliculus of the tree shrew (*Tupaia glis*), *J. Comp. Neurol.*, 191: 133-151.
- Graham, J., Lin, C.S., and Kaas, J.H. (1979) Subcortical projections of six visual cortical areas in the owl monkey, *Aotus trivirgatus*, *J. Comp. Neur.*, 187: 557-580.
- Graham, J., Pearson, H., Berman, N., and Murhy, H. (1981) Laminar organization of superior colliculus in the rabbit: a study of receptive-field properties of single units, *J. Neurophysiol.*, 45: 915-932.
- Graham, R., and Karnovsky, M.J. (1966) The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: Ultrastructural cytochemistry by a new technique, *J. Histochem. Cytochem.*, 14: 291-302.
- Graybiel, A.M. (1975) Anatomical organization of retinotectal afferents in the cat: An autoradiographic study, *Brain Res.*, 96: 1-23.
- Guillery, R.W. (1969) The organization of synaptic interconnections in the laminae of the dorsal lateral geniculate nucleus of the cat, *Z. Zellforsch.*, 96: 1-38.
- Hadley, R.T., and Trachtenberg, M.C. (1978) Poly-I-Ornithine enhances the uptake of horseradish peroxidase, *Brain Res.*, 158: 1-14.
- Haight, J.R., Sanderson, K.J., Neylon, I., and Patten, G.S. (1980) Relationships of the visual cortex in the marsupial brush-tailed opossum, *Trichosurus vulpecula*, a horseradish peroxidase and autoradiographic study, *J. Anat.*, 131: 387-413.
- Hamori, J., Pasik, P., and Pasik, T. (1975) Postnatal differentiation of "presynaptic dendrites" in the lateral geniculate nucleus of the rhesus monkey. In G.W. Kreutzberg (Ed.), *Advances in Neurology*, p.p. 149-161.
- Hansson, H.-A. (1973) Uptake and intracellular bidirectional transport of horseradish peroxidase in retinal ganglion cells, *Exp. Eye Res.*, 16: 377-388.
- Harting, J.K., and Guillery, R.W. (1976) Organization of retinocollicular pathways in the cat, *J. Comp. Neur.*, 166: 133-144.
- Harting, J.K., Hall, W.C., Diamond, I.T., Martin, G.F., (1973) Anterograde degeneration study of the superior colliculus in *Tupaia glis*: Evidence for a subdivision between superficial and deep layers, *J. Comp. Neur.*, 148: 361-386.

- Hendrickson, A., and Edwards, S.B. (1978) The use of axonal transport for autoradiographic tracing of pathways in the central nervous system. In R.T. Robertson (Ed.), *Neuroanatomical Research Technik*, Academic press, New York, p.p. 241-290.
- Hofbauer, A., and Dräger, U. (1981) Depth segregation of retino-tectal projections in the mouse, *ARVO abstracts 1981*, Supp. to *Invest. Ophthalmol. and Vis. Science*, 20: 175.
- Holländer, H. (1970) The section embedding (SE) technique. A new method for the combined light microscopic and electron microscopic examination of central nervous tissue, *Brain Res.*, 20: 29-47.
- Holländer, H. (1981) Target preparation for histochemical studies with the electron microscope, *Science Tools*, 28: 8-10.
- Holländer, H., and Vaaland, J. (1968) A reliable staining method for semi-thin sections in experimental neuroanatomy, *Brain Res.*, 10: 120-126.
- Holländer, H., Tietze, J., and Distel, H. (1979) An autoradiographic study of the subcortical projections of the rabbit striate cortex in the adult and during postnatal development, *J. Comp. Neurol.*, 184: 783-794.
- Hubel, D.H., LeVay, S., and Wiesel, T.N. (1975) Mode of termination of retinotectal fibers in macaque monkey: an autoradiographic study, *Brain Res.*, 96: 25-40.
- Huber, G.C., and Crosby, E.C. (1943) A comparison of the mammalian and reptilian tecta, *J. Comp. Neurol.*, 78: 133-168.
- Hughes, A. (1971) Topographical relationship between the anatomy and physiology of the rabbit visual system, *Doc. Ophthalmol.*, 30: 33-60.
- Illing, R.-B., and Wässle, H. (1979) Visualization of the HRP reaction product using the polarization microscope, *Neurosci. Lett.*, 13: 7-11.
- Itaya, S.K., Williams, T.H., and Engel, E.I. (1978) Anterograde transport of horseradish peroxidase enhanced by poly-L-ornithine, *Brain Res.*, 150: 170-176.
- Itoh, K., Konishi, A., Nomura, S., Mizuno, N., Nakamura, Y., and Sugimoto, T. (1979) Application of coupled oxidation reaction to electron microscopic demonstration of horseradish peroxidase: Cobalt-glucose oxidase method, *Brain Res.*, 175: 341-346.
- Itoh, K., Conley, M., and Diamond, I.T. (1980) Ganglion cell projections to the superior colliculus, lateral geniculate pretectum and ventral lateral geniculate in the cat, *Soc. Neurosci. Abstr.*, 6: 347.

- Kanaseki, T., and Sprague, J.M. (1974) Anatomical organization of pretectal nuclei and tectal laminae in the cat, *J. Comp. Neur.*, 158: 319-338.
- Karlsson, J.-O., and Sjöstrand, J. (1972) Axonal transport of proteins in retinal ganglion cells. Characterization of the transport to the superior colliculus. *Brain Res.*, 47: 185-194.
- Kato, S. (1941) Über den feineren Bau des rostralen Zweihügels des Kaninchens, *Z. mikrosk. anatom. Forsch.*, 50: 207-255.
- Kato, S. (1941a) Über den feineren Bau des rostralen Hügels der Ziege. (japanisch), *Hokuetsu Igakushi*, 56: 744-749.
- Kato, S. (1941b) Über den feineren Bau des rostralen Hügels der Ratte, Manuskript
- Kawamura, J.M., Sprague, J.M., and Niimi, K. (1974) Corticofugal projections from the visual cortices to the thalamus, pretectum and superior colliculus in the cat, *J. Comp. Neur.*, 158: 339-362.
- Keefer, D.A. (1978) Horseradish peroxidase as a retrogradely-transported, detailed dendritic marker, *Brain Res.*, 140: 15-32.
- Kim, C.C., and Strick, P. (1976) Critical factors involved in the demonstration of horseradish peroxidase retrograde transport, *Brain Res.*, 103: 356-361.
- Koelliker, A. (1896) Handbuch der Gewebelehre des Menschen 6. Aufl., 2.Band: Nervensystem des Menschen und der Thiere, Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- Land, P.W., and Lund, R.D. (1979) Development of the rat's uncrossed retinotectal pathway and its relation to plasticity studies, *Science*, 205: 698-700.
- IaVail, J.H., and IaVail, M.M. (1974) The retrograde intra-axonal transport of horseradish peroxidase in the chick visual system: A light and electron microscopic study, *J. Comp. Neurol.*, 157: 303-358.
- IaVail, J.H., Rapisardi, S., and Sugino, I.K. (1980) Evidence against the smooth endoplasmic reticulum as a continuous channel for the retrograde axonal transport of horseradish peroxidase, *Brain Res.*, 191: 3-20.
- Lund, R.D. (1969) Synaptic patterns of the superficial layers of the superior colliculus of the rat, *J. Comp. Neur.*, 135: 179-208.

- Lund, R.D. (1972) Synaptic patterns in the superficial layers of the superior colliculus of the monkey *Macaca mulatta*, *Exp. Brain Res.*, 15: 194-211.
- Lund, R.D. (1972) Anatomical studies on the superior colliculus, *Invest. Ophthalmol.*, 11: 434-441.
- Lund, R.D., Lund, P.W., and Boles, J. (1980) Normal and abnormal uncrossed retinotectal pathways in rats: An HRP study in adults, *J. Comp. Neurol.*, 189: 711-720.
- Malmgren, I., and Olsson, Y. (1978) A sensitive method for histochemical demonstration of horseradish peroxidase in neurons following retrograde axonal transport, *Brain Res.*, 148: 279-294.
- Markowitz, J., Archibald, J., and Downie, H.G. (1964) Experimental surgery, The Williams Wilkins Company, Baltimore.
- Masland, R.H., Chow, K.I., and Stewart, D.I. (1971) Receptive-field characteristics of superior colliculus neurons in the rabbit, *J. Neurophysiol.*, 34: 148-156.
- Mathers, I.H. (1977) Effects of neonatal deafferentiation on the superficial laminae of the S.C. *Brain Res.*, *Brain Res.*, 126: 19-30.
- Mathers, I.H. (1977) Synaptic development in the rabbit superior colliculus, *Anat. Record*, 187: 4.
- Mathers, I.H. (1977) Retinal and visual cortical projection to the superior colliculus of the rabbit, *Exper. Neurol.*, 57: 698-712.
- Mesulam, M.-M. (1978) Tetramethyl benzidine for horseradish peroxidase neurohistochemistry: A non-carcinogenic blue reaction-product with superior sensitivity for visualizing neural afferents and efferents, *J. Histochem. Cytochem.*, 26: 106-117.
- Mesulam, M.-M., and Mufson, E.J. (1980) The rapid anterograde transport of horseradish peroxidase, *Neuroscience*, 5: 1277-1286.
- Mesulam, M.-M., and Rosene, D.L. (1979) Sensitivity in horseradish peroxidase neurohistochemistry: A comparative and quantitative study of nine methods, *J. Histochem. Cytochem.*, 27: 763-773.
- Meynert, T. (1872) In S. Stricker (Ed.), *Handbuch der Lehre von den Geweben des Menschen und der Thiere* 2. Band: Vom Gehirn der Säugethiere, Wilhelm Engelmann, Leipzig 1872, p.p. 694-808.
- Mizuno, N., Konishi, A., Itoh, K., Iwahori, N., and Nakamura, Y. (1980) Identification of axon terminals of the cerebello-olivary fibers in the cat: An electron microscope study using the anterograde horseradish peroxidase method, *Neurosci. Lett.*, 20: 11-14.

- Morell, J.I., Greenberger, I.M., and Pfaff, D.W. (1981) Comparison of horseradish peroxidase visualization methods: Quantitative results and further technical specifics, *J. Histochem. Cytochem.*, 29: 903-916.
- Nauta, W.J.H. (1957) Silver impregnation of degenerating axons. In W.F.Windle (Ed.), *New Research Techniques of Neuroanatomy*, Charles C. Thomas Publisher, Springfield, p.p. 17-26.
- Nauta, H.J.W., Kaiserman-Abramof, I.R., and Iasek, R.J. (1975) Electron microscopic observations of horseradish peroxidase transported from the caudoputamen to the substantia nigra in the rat: possible involvement of the agranular reticulum, *Brain Res.*, 85: 373-384.
- Öki, T. (1968) An experimental study on the fiber connection of rabbit's optic nerve, *Acta anat. nippon*, 43: 255-281.
- Ogren, M., and Hendrickson, A. (1976) Pathways between striate cortex and subcortical regions in *Macaca mulatta* and *Saimiri sciureus*: Evidence for a reciprocal pulvinar projection, *Exp. Neurol.*, 53: 780-800.
- Okada, Y. (1974) Distribution of γ -aminobutyric acid (GABA) in the layers of superior colliculus of the rabbit, *Brain Res.*, 75: 362-365.
- Osculati, F., Gazzanelli, G., Marelli, M., Franceschini, F., Amati, S., and Cinti, S. Critical appraisal of the technique of labeling neurons by retrograde transport of horseradish peroxidase, *J. Submicroscopic. Cytol.*, 12: 391-400.
- Peters, A. (1970) The fixation of central nervous tissue and the analysis of electron micrographs of the neuropil, with special reference to the cerebral cortex. In W.J.H.Nauta S.O.E.Ebbesson, *Contemporary Research Methods in Neuroanatomy*, Springer Verlag, Berlin - New York, p.p. 56-76.
- Peters, A., Palay, S.I., and Webster, H.de F. (1970) *The Fine Structure of the Nervous System. The Cells and their Processes*, Harper Row, New York.
- Pollack, J.G., and Hickey, T.I. (1979) The distribution of retinocollicular axon terminals in rhesus monkey, *J. Comp. Neur.*, 185: 587-602.
- Powell, T.P.S. (1976) Bilateral cortico-tectal projection from the visual cortex in the cat, *Nature*, 260: 526-527.
- Provis, J.M. (1979) The distribution and size of ganglion cells in the retina of pigmented rabbit: Quantitative analysis, *J. Comp. Neur.*, 185: 121-138.

- Provis, J.M., and Watson, C.R.R. (1981) The distribution of ipsilaterally and contralaterally projecting ganglion cells in the retina of the pigmented rabbit, *Exp. Brain Res.*, 44: 82-92.
- Ralston, H.J., and Chow, K.I. (1973) Synaptic reorganization in the degenerating lateral geniculate nucleus of the rabbit, *J. Comp.Neur.*, 147: 321-350.
- Ralston, H.J., and Herman, M.M. (1969) The fine structure of neurons and synapses in the ventrobasal thalamus of the cat, *Brain Res.*, 14: 77-97.
- Ramon-Moliner, E. (1975) Can dendrites be presynaptic?. In G.W.Kreutzberg (Ed.), *Advances in Neurology 12, Physiology and Pathology of Dendrites*, Raven Press, New York, p.p. 135-147.
- Reperant, J. (1975) The orthograde transport of horseradish peroxidase in the visual system, *Brain Res.*, 85: 307-312.
- Reynolds, E.S. (1963) The use of lead citrate at high pH as electron-opaque stain in electron microscopy, *J. Cell Biol.*, 17: 208-212.
- Rhoades, R. (1981) Expansion of the ipsilateral visual corticotectal projection in hamsters subjected to partial lesions of the visual cortex during infancy: Anatomical experiments, *J. Comp. Neur.*, 197: 425-445.
- Riley, J.N., Card, J.P., and Moore, R.Y. (1981) A retinal projection to the lateral hypothalamus in the rat, *Cell Tissue Res.*, 214: 257-269.
- Rinvik, E. (1972) Organization of thalamic connections from motor and somatosensory cortical areas in the cat. In T.I.Frigyesi E.Rinvik, and M.D.Yahr (Eds.), *Corticothalamic Projections and Sensorimotor Activities*, Raven Press, New York, p.p. 88-90.
- Robson, J.A., and Hall, W.C. (1976) Projections from the superior colliculus to the dorsal lateral geniculate nucleus of the grey squirrel (*Sciurus carolinensis*), *Brain Res.*, 113: 379-385.
- Rodieck, R.W. (1979) Visual pathways, *Ann. Rev. Neurosci.*, 2: 193-225.
- Rosene, D.I., and Mesulam, M.-M. (1978) Fixation variables in horseradish peroxidase neurohistochemistry. I. The effects of fixation time and perfusion procedures upon enzyme activity, *J. Histochem Cytochem.*, 26: 28-39.
- Sakumoto, T., Nagai, T., Kimura, H., and Maeda, T. (1980) Electron microscopic visualization of tetramethyl benzidine reaction product on horseradish peroxidase neurohistochemistry, *Cell. Molec. Biol.*, 26: 211-216.

- Sanderson, K.J., Pearson, I.J., and Dixon, P.G. (1978) Altered retinal projections in brushtailed possum, *trichosurus vulpecula*, following removal of one eye, *J. Comp.Neur.*, 180: 841-868.
- Schönitzer, K., and Holländer, H. (1982) Anterograde tracing of horseradish peroxidase (HRP) with the electron microscope using the tetramethylbenzidine reaction, *J. Neurosci. Methods*, 4: 373 - 383.
- Schubert, P., and Holländer, H. (1975) Methods for the delivery of tracers to the central nervous system. In W.M.Cowan and M.Cuenod (Eds.), *The use of axonal transport for studies of neuronal connectivity*, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, p.p. 114-125.
- Sigl, K. (1981) Experimentelle Untersuchungen zur Entwicklung des Colliculus superior und seiner Verbindungen beim Kaninchen, Dissertation der Universität München, München.
- Somogyi, P., Hodgson, A.J., and Smith, A.D. (1979) An approach to tracing neuron networks in the cerebral cortex and basal ganglia. Combination of Golgi staining, retrograde transport of horseradish peroxidase and anterograde degeneration of synaptic boutons in the same material, *Neuroscience*, 4: 1805-1852.
- Sotelo, C., and Riche, D. (1974) The smooth endoplasmic reticulum and the retrograde and fast orthograde transport of horseradish peroxidase in the nigro-striato-nigral loop, *Anat. Embryol.*, 146: 209-218.
- Sterling, P. (1971) Receptive fields and synaptic organization of the superficial gray layer of the cat superior colliculus, *Vis. Res.*, Suppl. 3: 309-328.
- Sterling, P. (1973) Quantitative mapping with the electron microscope: retinal terminals in the superior colliculus, *Brain Res.*, 54: 347-354.
- Stewart, D.I., Birt, D., and Towns, I.C. (1973) Visual receptive-field characteristics of superior colliculus neurons after cortical lesions in the rabbit, *Vision Res.*, 13: 1965-1977.
- Streit, P., and Reubi, J.C. (1977) A new and sensitive staining method for axonally transported horseradish peroxidase (HRP) in the pigeon visual system, *Brain Res.*, 126: 530-537.
- Stürmer, C., Bielenberg, K., and Spatz, W.B. (1980) Electron-microscopical identification of 3,3',5,5'-tetra- methyl benzidine reacted horseradish peroxidase after retrograde axoplasmic transport, *Neurosci. Lett.*, 23: 1-5.

- Takahashi, Y., and Ogawa, T. (1978) Electrophysiological properties of morphologically identified neurones in the rabbit's superior colliculus, *Exp. Neur.*, 60: 254-266.
- Tartuferi, F. (1884) Sull'anatomia minuta dell'eminenza bigemina anteriore dell'uomo, *Arch. ital. per le mal. nerv.*, 22: 3-37.
- Tigges, J., and Tigges, M. (1981) Distribution of retinofugal and corticofugal axon terminals in the superior colliculus of the squirrel monkey, *Invest. Ophthalmol.*, 20: 149-158.
- Tigges, M., and Tigges, J. (1975) Presynaptic dendritic cells and two other classes of neurons in the superficial layers of the superior colliculus of the chimpanzee, *Cell Tissue Res.*, 162: 279-295.
- Tigges, M., Tigges, J., Luttrell, G.L., and Frazier, C.M. (1973) Ultrastructural changes in the superficial layers of the superior colliculus in *Galago crassicaudatus* (primates) after eye enucleation, *Z. Zellforsch.*, 140: 291-307.
- Turner, P.T., and Harris, A.B. (1974) Ultrastructure of exogenous peroxidase in cerebral cortex, *Brain Res.*, 74: 305-326.
- Updyke, B.V. (1977) Topographic organization of the projections from cortical areas 17, 18, and 19 onto the thalamus, pretectum and superior colliculus in the cat, *J. Comp. Neur.*, 173: 81-122.
- Valdivia, O. (1971) Methods of fixation and the morphology of synaptic vesicles, *J. Comp. Neurol.*, 142: 257-274.
- Valverde, F. (1973) The neuropil in superficial layers of the superior colliculus of the mouse. A correlated Golgi and electron microscopic study, *Z. Anat. Entwickl. Gesch.*, 142: 117-147.
- Vaney, D.I., Levick, W.R., and Thibos, I.N. (1981) Rabbit retinal ganglion cells receptive field classification and axonal conduction properties, *Exp. Brain Res.*, 44: 27-33.
- Vaney, D.I., Peichl, I., Wässle, H., and Illing, R.-B. (1981a) Almost all ganglion cells in the rabbit retina project to the superior colliculus, *Brain Res.*, 212: 447-453.
- Vrensen, G., and De Groot, D. (1977) Quantitative aspects of the synaptic organization of the superior colliculus in control and dark-reared rabbits, *Brain Res.*, 134: 417-428.
- Walberg, F., Brodal, A., and Hoddevik, G.H. (1976) A note on the method of retrograde transport of horseradish peroxidase as a tool in studies of afferent cerebellar connections, particularly those from the inferior olive; with comments on the orthograde transport in Purkinje cell axons, *Exp. Brain Res.*, 24: 383-401.

- Walberg, F., Holländer, H., and Grofova, I. (1976) An autoradiographic identification of Purkinje axon terminals in the cat, *J. Neurocytol.*, 5: 157-169.
- Weber, J.T., Kaas, J.H., and Harting, J.K. (1978) Retinocollicular pathways in siamese cats: an autoradiographic analysis, *Brain Res.*, 148: 189-196.
- West, J.R., and Black, A.C. (1979) Enhancing the anterograde movement of HRP to label sparse neuronal projections, *Neurosci. Lett.*, 12: 35-40.
- Winfield, D.A., Gatter, K.C., and Powell, T.P.S. (1975) An electron microscopic study of retrograde and orthograde transport of horseradish peroxidase to the lateral geniculate nucleus of the monkey, *Brain Res.*, 92: 462-467.
- Winkler, C., and Potter, A. (1911) *An Anatomical Guide to Experimental Researches on the Rabbit's Brain. A series of 40 frontal sections*, W. Versluys, Amsterdam.
- Yoshida, M. (1957) Zur vergleichenden Myeloarchitektonik des rostralen Hügels bei Mammaliern., Zitiert nach Kanaseki und Sprague (1974), *Arb. I. Anat. Inst. Univ. Kyoto*, 29: 1-75.
- Zeman, W., and Innes, J.R.M. (1963) *Craigi's Neuroanatomy of the Rat*, revised and expanded, Academic Press, New York.

8. Z U S A M M E N F A S S U N G

Der Aufbau der oberflächlichen Schichten des Colliculus superior beim Kaninchen wurde nach licht- und elektronenmikroskopischer Untersuchung beschrieben. Es werden folgende Schichten voneinander abgegrenzt: Stratum zonale (SZ), Stratum griseum superficiale (SGS) und Stratum opticum (SO). SZ und SGS werden jeweils in drei Unterschichten (ein oberes, mittleres und ein tiefes SZ bzw. SGS) eingeteilt.

Die Terminalfelder der gekreuzten und ungekreuzten retinotectalen Projektion sowie das Terminalfeld der kortikotectalen Projektion von der primären Sehrinde wurden mittels Silberimprägnation, Autoradiographie und HRP Markierung dargestellt und beschrieben.

1. Die gekreuzten retinocolliculären Fasern enden im ganzen kontralateralen Colliculus. Die intensivste Markierung ist im SZ und im darunterliegenden oberen SGS. Im vorderen und lateralen Teil des Colliculus ist die Markierung etwas stärker als hinten und medial.
2. Die ungekreuzten retinocolliculären Fasern enden in einzelnen kleinen Terminalfeldern im tiefen SGS des vorderen lateralen Teils des Colliculus.
3. Die kortikalen Fasern enden im SGS und SZ des gleichseitigen Colliculus, die stärkste Markierung ist im mittleren SGS.

Das kontralaterale retinotectale und das (primär visuelle) kortikotectale Terminalfeld wurden mit einer neuen Methode, die im Anhang beschrieben wird, zusätzlich elektronenmikroskopisch untersucht und beschrieben. Die Dichte der Markierung in verschiedener Tiefe im Colliculus wurde bestimmt. Die retinale

Markierung ist am stärksten in den obersten 100 μ m, reicht aber bis ins untere SGS (Abb. 10). Die kortikale Markierung reicht vom SZ bis ins SO und hat ein Maximum im mittleren SGS (Abb. 11).

Sowohl die retinalen als auch die kortikalen markierten Boutons haben gewöhnlich viele runde synaptische Vesikel. Retinale Boutons haben Mitochondrien mit meistens heller Matrix. Im SZ haben sie durchschnittlich weniger Mitochondrien als im SGS. Kortikale Boutons haben gewöhnlich Mitochondrien mit dunkler Matrix. Markierte retinale Fasern (myelinisierte Axone) nehmen nach unten an Grösse zu. Sowohl die retinalen als auch die kortikalen Boutons bilden gewöhnlich asymmetrische Synapsen, die kortikalen nur mit dendritischen Profilen, die retinalen darüberhinaus mit axonalen Profilen.

Die im Anhang beschriebene Tracer Methode ermöglicht die parallele licht- und elektronenmikroskopische Untersuchung von Terminalfeldern nach anterogradem Transport von Meerrettichperoxidase (HRP) unter Verwendung von Tetramethylbenzidin (TMB) als Chromogen.

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich Herrn Professor H. Holländer danken, der mich in die Neuroanatomie eingeführt hat und mir das Thema der vorliegenden Arbeit überlassen hat. Besonders danke ich ihm für seine Anregungen und seine stetige Diskussionsbereitschaft.

Ausserdem danke ich den Mitarbeiterinnen des neuroanatomischen Labors: Frau Brigitte Schwarz für ihre Hilfe bei den elektronenmikroskopischen Präparationen, Frau Renate Scheil für ihre Hilfe bei histologischen Arbeiten und Frau Ruth Müller für ihre Assistenz bei den Operationen und ihre Hilfe bei der Niederschrift des Manuskriptes.

Schliesslich danke ich Herrn Professor Bruckmoser für sein Interesse an der Arbeit und für die Betreuung im Rahmen der Fakultät für Biologie.

L E B E N S L A U F

- 1950 Geboren in Innsbruck am 9.9. 1950
- 1955 Umzug nach München
- 1970 Abitur am Rupprecht Gymnasium, München
- 1970/73 Studium der Biologie an der Ludwig-
 Maximilians-Universität, München
- 1973/74 Ein Jahr Aufenthalt auf den Galapagos
 Inseln (als biologischer Reiseführer)
- 1974/78 Fortsetzung des Studiums
- 1978 Diplom in Biologie
 Prüfungsfächer: Zoologie, systematische
 Botanik und Paläontologie.
 Diplomarbeit: "Morphologie der Antennen-
 putzapparate verschiedener Apoidea (Hym.)
 und die Funktion des Putzapparates bei
 Apis mellifica". Betreuer: Prof. M. Renner
- 1979/81 Doktorarbeit im Max-Planck-Institut für
 Psychiatrie, München, unter der Leitung
 von Prof. H. Holländer
- seit 1982 Wissenschaftlicher Assistent bei
 Prof. H. Holländer

